

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A krónikus mieloid leukémia tirozinkináz-gátló
kezelése, a terápia okozta mellékhatások
laboratóriumi és klinikai vizsgálata, különös
tekintettel a vaszkuláris hematológiai eltérésekre**

Dr. Mezei Gabriella Anna

Témavezető: Dr. Batár Péter István



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

A krónikus mieloid leukémia tirozinkináz-gátló kezelése, a terápia okozta mellékhatások laboratóriumi és klinikai vizsgálata, különös tekintettel a vaszkuláris hematológiai eltérésekre

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Mezei Gabriella Anna okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem klinikai orvostudományok doktori iskolája (konzervatív orvostudományok és klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Batár Péter István

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Takács István, PhD
Dr. Szegedi István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet B
épület, tárgyaló
2024.07.02. 12:30

Az értekezés bírálói:

Dr. Ujfalusi Anikó, PhD
Dr. Ilonczai Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora
tagok: Dr. Ujfalusi Anikó, PhD
Dr. Ilonczai Péter, PhD
Prof. Dr. Takács István, PhD
Dr. Szegedi István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A
épület, tanterem
2024.07.02. 14 óra

1. Bevezetés

A krónikus mieloid leukémia (CML) a krónikus mieloproliferatív neopláziák családjának a tagja. A 9-es és a 22-es kromoszómák hosszú karjai között létrejött reciprok transzlokáció (Philadelphia kromoszóma) következtében kialakuló fúziós gén egy szabályozatlan tirozinkináz aktivitással bíró fehérjét kódol (BCR::ABL1). Ez a kórosan fokozott tirozinkináz aktivitású fehérje a sejtosztódás, az adhézió, illetve a programozott sejthalál jelátviteli útvonalainak szigorúan szabályozott egyensúlyát felborítva a *BCR::ABL1* pozitív sejtek malignus transzformációjához vezet, és a betegségre jellemző klinikai képet alakítja ki. A malignus genetikai transzformáció molekuláris szintű megismerése segítette a célzott daganatellenes terápia kidolgozásához, amihez a BCR::ABL1 fehérje kóros tirozinkináz aktivitásának gátlása kiváló célpontot jelentett. Druker és munkatársai az 1990-es évek végén fejlesztették ki az STI571 néven ismertté vált, majd imatinib néven törzkönyveztet molekulát, ami a BCR::ABL1 fehérje kináz „zsebében” elfoglalja az ATP helyét, így akadályozva meg a szubsztrát foszforilációját. A korábban alkalmazott α -interferon kezelésre nem reagáló vagy intoleráns, krónikus fázisú betegeknél napi 300 mg feletti dózis esetén 90%-ban komplett hematológiai, 50%-ban pedig komplett vagy major citogenetikai válasz alakult ki. A klinikai vizsgálatok tapasztalatai az évek során minden várakozást felülmúlva erősítették meg a tirozinkináz-gátló (TKI) kezelés kezdeti kiváló eredményeit. Az imatinib igen kedvező gyógyszer-tulajdonságokkal rendelkezik, szájon át alkalmazható, nagymértékben specifikus, jól tolerálható gyógyszernek bizonyult, és a mellékhatások is minimálisak voltak. Az elmúlt két évtized folyamán a célzott molekuláris terápia a malignus hematológiai betegségek gyógyításának alapvető eszközévé vált. A második (nilotinib, dasatinib, bosutinib) és harmadik (ponatinib) generációs tirozinkináz-gátlók kifejlesztésével az imatinibre nem megfelelően reagáló vagy intoleráns esetek is kezelhetővé váltak. A második generációs TKI-kezelések mellett azonban jóval nagyobb arányban alakulhatnak ki súlyos mellékhatások is. A nilotinib és a ponatinib kezelések kapcsán kardiovaszkuláris események (artériás és vénás tromboembólia, akut koronária szindróma, stroke, perifériás érbetegség, hipertónia), dasatinib kezelés mellett pedig mellkasi folyadék gyülem és vérékenység (gyomor-bél traktust, központi idegrendszer) gyakoribb előfordulását észlelték.

A CML felismerésekor a betegek több mint fele 65 évnél idősebb. Ennek megfelelően a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulása is gyakoribb. A kezelés megkezdése előtt ezért részletes kardio-metabolikus szűrővizsgálatok elvégzése javasolt, melyeket a folyamatos TKI

terápia mellett adott időpontokban rendszeresen ellenőrizni kell. A szűrővizsgálatok elvégzése az iszkémiás szívbetegséghez, az iszkémiás cerebrovaszkuláris eseményekhez, vagy a perifériás artériás elzáródásos betegséghez vezető vaszkuláris események idő előtti, valamint a magasvérnyomás betegség időben történő felismerését és megelőzését segíti. A dazatinibbel végzett korábbi *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok a primer hemosztázis elégtelen működését igazolták. A nilotinib és a ponatinib kezelések mellett észlelt gyakori kardiovaszkuláris mellékhatások háttere ugyanakkor kevésbé tisztázott.

A primer hemosztázis érzékeny indikátorai a kettős agonista (kollagén és trombin) aktiváció kapcsán képződő "coated"-vérlemezkék (***collagen and thrombin activated***), melyek aktivált vérlemezkék egy speciális alcsoportját alkotják. A "coated"-vérlemezkék egy igen jelentős prokoaguláns aktivitással bíró aktivált thrombocita alpopulációt jelentenek. Közös jellemzőjük a mitokondriális depolarizáció, a tartós citoplazmatikus kalcium-szint emelkedés, a foszfatidil-szerin (PS) sejtfelszíni expressziója, és a fibrinogén (GPIIb/IIIa) receptorok inaktiválódása. Felszínükön számos funkcionálisan aktív prokoaguláns fehérje, köztük fibrinogén, V-ös faktor és von Willebrand faktor mutatható ki. Ezeknek a prokoaguláns "coated"-vérlemezkéknek a túlermelődése korábban számos trombotikus folyamatban igazolható volt. Ugyanakkor a "coated"-vérlemezkék csökkent aránya mutatható ki spontán agyvérzés, lacunáris stroke, illetve súlyos hemofília A eseteiben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Krónikus mieloid leukémia

A tirozinkináz-gátló kezelés radikális változást hozott a CML kezelésében. Az 1970-es években - amikor csak citotoxikus szerek álltak rendelkezésre - a 10 éves túlélési arány 20% volt. Ez 50%-ra emelkedett az allogén csontvelő-átültetés és az α -interferon bevezetésével. Az igazán jelentős változás az elmúlt 25 évben, a tirozinkináz-gátló kezeléssel következett be. Ma a 10 éves túlélés közel 90%; a betegek túlélése az egészséges felnőttekével közel egyező. Jelenleg a betegek jelentős részénél a TKI kezelés folyamatos, életfogytig tartó terápiát jelenthet. A diagnóziskor rögzített beteg- és betegség-specifikus jellemzők (életkor, lép-méret, vérlemezkeshám, valamint a blasztok aránya, eozinofília és bazofília mértéke a perifériás vérben) alapján a kórlefolyás megjósolható. A prognózis meghatározására számos pontrendszer ajánlott. Ezek közül a Sokal index a legrégebben használt, ezt alkalmazták a legtöbb klinikai vizsgálatban is. Az egyes pontrendszerek kockázati tényezőit a TKI kezelésre adott válasz, és a túlélés közötti

összefüggések megítélésére határozták meg. Mivel a betegek többsége ma már a leukémiás progressziótól független okok miatt hal meg - miközben a CML tartós és mély molekuláris remisszióban van - újabb kockázatbecslő pontrendszereket is kidolgoztak a CML-hez köthető halálozás valószínűségének előrejelzésére. Ezek a EUTOS (European Treatment and Outcome Study for CML) és az EUTOS hosszú távú túlélési (EUTOS long term survival: ELTS) pontszámok. Az ELTS pontszám ugyanazokat az egyszerű vérkép adatokat, a lépméretet, valamint a kort használja, mint a Sokal index. A fő különbség az életkor prognosztikai értékében van, mivel a TKI-vel kezelt betegeknél a kor a teljes túlélést kevésbé befolyásolja (ELTS pontszám), mint a hagyományos kemoterápiával kezelt betegek esetén (Sokal pontszám).

A CML kezelésében jelenleg elfogadott rizikó-adaptált kezelési stratégia alkalmazása során előbb mindig a terápiás célt kell megválasztanunk. A fiatal betegeknél, egyéb társbetegség hiányában a minél gyorsabban elért, minél mélyebb molekuláris válasz (DMR), és a kezelésmentes remisszió (TFR) az elsődleges cél. Az idősebb, számos társbetegségben is szenvedő betegeknél pedig önmagában a túlélés, az életminőség javítása, az akcelerált és a blasztos fázis megelőzése a kitűzött cél. A beteg életkora, általános állapota és a kísérő betegségek értékelése mellett a választott TKI mellékhatás profilja is kiemelkedően fontos jelentőséggel bír.

A TKI kezelés során, az European Leukemia Network (ELN) legújabb (2023. október) ajánlásai alapján meghatározott időpontokban ellenőrizni kell a hematológiai, citogenetikai és a molekuláris válaszokat, majd a kapott eredmények alapján kell döntenie a további teendők (kezelés folytatása, terápia módosítása, allogén őssejt transzplantáció, stb.) felől. A kórképet meghatározó genetikai instabilitás miatt a citogenetikai státusz megállapítása a diagnóziskor, majd annak követése a kezelés során elengedhetetlenül fontos, ugyanis a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) és a PCR vizsgálatok az esetleges egyéb kromoszóma eltéréseket nem tudják kimutatni. Bizonyos kromoszóma aberrációk CML-ben nagyobb gyakorisággal fordulnak elő, és befolyásolják a betegség kimenetelét is. A *BCR::ABL1* fúziós gén mennyiségi meghatározása (reverz transzkriptáz kvantitatív PCR módszer, RT-qPCR) a TKI kezelés követésének alapja. A módszer sztenderdizálása (international score, IS) lehetővé tette az egyes molekuláris laboratóriumok által kiadott eredmények összehasonlíthatóságát, és ennek megfelelően egységes, nemzetközi irányelvek kialakítását. Kontrollált klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a kezelés 3. hónapjában mért 10% alatti *BCR::ABL1* [IS] érték a progresszió

mentes túlélést (PFS) megbízhatóan előrejelzi. A TKI kezelés 6. hónapjában mért 1% feletti vagy 12. hónapjában mért 0,1% feletti *BCR::ABL1* [IS] értékek a kezelés elégtelenségét jelentik és ilyen esetekben terápia váltás szükséges. Az RT-qPCR érzékenységének növelésével a mély molekuláris válaszok is értékelhetővé váltak, lehetőséget teremtve az esetleges későbbi terápia mentes időszak pontos monitorozására is.

Az első vonalban alkalmazott TKI-vel szemben 30-40%-ban rezisztencia vagy intolerancia alakulhat ki. A rezisztencia leggyakoribb oka a *BCR::ABL1* fúziós gén szomatikus pontmutációja, amely a kórkép genetikai instabilitásából adódik. Jelenleg több mint 100 különböző mutáció ismert. Előfordulásuk az akcelerált és blasztos fázisban gyakoribb, és rossz prognózist jelentenek. A pontmutáció a *BCR::ABL1* fehérje térszerkezetében olyan konformáció változást hozhat létre, amely megakadályozza a TKI molekula specifikus kapcsolódását az *ABL1* tirozinkináz doménjéhez (TKD), és a kezelés eredménytelenségéhez vezethet. A kórlefolyás során egyszerre több mutáció is kialakulhat, amely érinthet több *BCR::ABL1* pozitív sejtklont (poliklonális mutáció), vagy egy adott klón *BCR::ABL1* génszakaszán belül alakul ki ("compound" mutáció). Több mutáció esetén ez utóbbi jóval gyakoribb és egyszerre több TKI-vel szemben is rezisztenciát okozhat. A T315I mutáció jelenléte a ponatinib és aszcininib kivételével az összes jelenleg rendelkezésre álló TKI terápiával szembeni rezisztenciát okoz ("gatekeeper" mutáció).

A TKI rezisztencia kialakulhat a TKI nem megfelelő plazma koncentrációja miatt is. Ennek oka leggyakrabban az elégtelen beteg *compliance*, valamint a terápiahűség (*adherencia*) hiánya. Az *adherenciát* leginkább a TKI kezelés okozta mellékhatások befolyásolják (intolerancia). A korai, általában hematológiai mellékhatások (hematológiai toxicitás) a TKI átmeneti elhagyásával, a dózis csökkentésével, vagy másik TKI-ra való váltással jól uralhatóak. Az elhúzódó, nem súlyos (grade 1-2), de az életminőséget tartósan negatívan befolyásoló mellékhatások jelentős *adherencia* gondot jelentenek és a *compliance* romlásával elégtelen terápiás válaszhoz vezetnek. Ilyenkor szükséges lehet a TKI plazma szintjének ellenőrzése. TKI rezisztencia gyanúja esetén a gyógyszer bevitelének pontosságát és a beteg terápiahűségét ellenőrizni kell. Megfelelő *compliance* mellett észlelt elégtelen válasz esetén terápia váltás, és ezzel egyidőben a *BCR::ABL1* TKD mutáció analízis végzése javasolt.

Jelenleg Magyarországon első terápiás vonalban az Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK) három TKI-t támogat (imatinib, nilotinib, dasatinib). Amíg az első vonalban

alkalmazott imatinib kezelés a legkevesebb mellékhatás mellett (a második generációs TKI kezeléshez hasonlóan) javítja a teljes túlélést, addig az első vonalban alkalmazott második generációs TKI terápia a gyorsabban kialakuló és mélyebb molekuláris válasz révén elérhetővé teheti a betegek számára a kezelésmentes túlélést, a teljes gyógyulás elvi lehetőségét is.

Az első vonalban alkalmazott TKI kezelések kapcsán kialakuló rezisztencia, vagy a betegek életminőségét hosszú távon negatívan befolyásoló mellékhatások (intolerancia) esetén a terápia módosítására van szükség. Primer vagy szekunder rezisztencia esetén minden esetben csontvelő és citogenetikai vizsgálat elvégzése szükséges az esetleges klonális evolúció (szerzett kromoszóma aberrációk) felismerése, és a betegség fázisának (akceleráció?, blasztos transzformáció?) pontos meghatározása miatt. Jelenleg Magyarországon második vonalban a NEAK három második generációs TKI kezelést támogat (nilotinib, dasatinib, bozutinib). A második generációs TKI kezelés evidenciái ugyanakkor elmaradnak az imatinib kezelés kapcsán nyert tapasztalatoktól, és a második generációs TKI-k okozta mellékhatások - melyek számos szervrendszert érinthetnek - is jóval gyakoribbak.

A TKI kezeléssel szembeni rezisztencia esetén javasolt a *BCR::ABL1* gén mutációs analízise is, ugyanis T315I mutáció esetén ponatinib vagy aszciminib kezelés, vagy allogén őssejt transzplantáció (allo-SCT) elvégzése szükséges.

A betegek kis részénél az első krónikus fázisban tapasztalt, több TKI-vel szemben is fennálló intolerancia, vagy rezisztencia eseteiben, a diagnóziskor észlelt, vagy a TKI kezelés során kialakuló, rossz prognózist jelző kromoszóma rendellenességek és T315I mutáció esetén allo-SCT elvégzése javasolt. Első vagy második vonalban alkalmazott második generációs TKI kezeléssel szemben kialakuló intolerancia vagy rezisztencia eseteiben szintén időben meg kell fontolni az allo-SCT lehetőségét. Ilyenkor (3. vagy 4. vonal) ugyanis az alternatívan választható TKI kezelés már nem minden esetben képes a megfelelő citogenetikai és molekuláris választ fenntartani. Ebben az esetben a választott második generációs TKI kezelést α -interferonnal lehet kiegészíteni, illetve ponatinib, vagy lehetőség szerint vizsgálati fázisban lévő egyéb TKI kezelés (pl. vodobatinib) elindítása mérlegelendő, és a beteget fel kell készíteni az allogén őssejt transzplantációra. Diagnóziskor észlelt akcelerációra utaló eltérések esetén a beteget nagy rizikójúnak kell tekinteni, és elégtelen terápiás válasz esetén allo-SCT elvégzése javasolt. Ellenőrzött TKI terápiahűség ellenére kialakuló akcelerált fázis az allo-SCT mielőbbi megszervezését indokolja.

A korai és mély molekuláris válasz elérése egyértelműen javítja mind a betegségmentes, mind pedig a teljes túlélést. Mindezek eléréséhez azonban a TKI kezelés folyamatos és pontos molekuláris biológiai ellenőrzése, ezen laboratóriumi módszerek sztenderdizált alkalmazása (laboratóriumon belüli és az egyes laboratóriumok közötti), az elért terápiás válaszok egységes irányelvek alapján történő, gondos mérlegelése, szükség esetén pedig a kezelés megfelelő módosítása szükségesek. A kezelésre adott válasz pontos molekuláris monitorozásával a betegek egyre nagyobb hányada érheti el a megfelelően mély molekuláris választ és kaphat reményt a tartós gyógyszer- és betegségmentes túlélésre. Legalább 5 éves folyamatos TKI kezelés és megfelelően mély (MR4.5 vagy MR5) és tartós (legalább 2 év) molekuláris válasz esetén, amennyiben terápia váltásra korábban csak TKI intolerancia miatt volt szükség, úgy a TKI kezelés felfüggesztése megpróbálható. Imatinib esetén a betegek 40%-a, míg második generációs TKI esetén 50%-a marad kezelés nélkül is tartósan mély molekuláris remisszióban. A kezelésmentes időszak első 6 hónapjában a molekuláris válasz szoros (minimum 4 hetente végzett) ellenőrzése indokolt. A TKI terápiát újból el kell kezdeni abban az esetben, ha a molekuláris válasz MMR-nál (MMR3) rosszabb értéket mutat.

2.2. Prokoaguláns, "coated"-vérlemezkék

A vérlemezkék prokoaguláns aktivitása több tényezőben is megnyilvánul. Az aktivált vérlemezkék felszínére negatív töltésű foszfolipidek (foszfatidilszerin, PS) kerülnek, melyek olyan enzim komplexek kialakulását segítik elő, melyek a koagulációs kaszkád hatékony működésében elengedhetetlenek (protrombináz és tenáz). A koagulációs kaszkád láncreakciók sorozatából áll, melyek során inaktív proenzimekből, prekursor fehérjékből aktív enzimek képződnek. A keletkező enzimek egymás hatását amplifikálva, valamint makromolekuláris komplexekbe rendeződve (protrombináz és tenáz komplexek) a vérlemezke aggregáción túl a véralvadás humorális (koagulációs) folyamatait erősítik. A protrombináz komplex részét képezi a X-es faktor, egy kofaktor fehérje (V-ös faktor), az enzim szubsztrátja (protrombin), a trombocita sejtmembrán anionos foszfolipid felszíne (PS), valamint a mindezek kötődéséhez feltétlenül szükséges kalcium. A komplexek létrejöttének előnye, hogy a trombin generáció lényegesen hatékonyabban mehet végbe az aktivált vérlemezkék felszínén, amely így közvetlenül az érfalsérülés helyére lokalizálódik.

Ezek az események kulcsfontosságúak a vérvesztés hatékony megakadályozása szempontjából. Ugyanakkor a folyamat pontos szabályozásának felborulása érelzáródást okozhat, ami

iszkémiához, és a létfontosságú szervek infarktushoz vezet. Az artériás trombózis az egyik legjelentősebb klinikai halálok, amelyet az ateroszklerotikus plakkok repedése vagy eróziója okoz, ami trombocita adhézióhoz, aggregációhoz, majd a koszorúerekben és az agyi artériákban szívizominfarktust, illetve stroke-ot okozó trombus-képződéshez vezet. Az artériás trombózis kialakulásának hátterében álló összetett hemosztatikus folyamatok vizsgálata fontos az iszkémiás szív- és érrendszeri betegségek patofiziológiájának megismerése szempontjából.

A vérlemezkék aktivációjuk során eltérő módon kerülhetnek aktivált állapotba, ezáltal heterogén sejtfelszíni tulajdonságokkal rendelkező, két különböző funkciójú alosztályt hoznak létre. A két alosztályt az aggregáló és a prokoaguláns vérlemezkék képezik. A prokoaguláns vérlemezkék al csoportjára az jellemző, hogy aktivációjukat követően az intracelluláris kalcium szint tartósan megemelkedik. Ennek következtében a vérlemezkék membránjának külső felszínén megnövekszik a PS expozíció. Ez a tenáz és protrombináz komplexek aktivitásának fokozódásához vezet, melyek a trombin- és fibrinképződést segítik elő. A prokoaguláns vérlemezkék a primer vérrög kialakulása során a trombus felszínére kerülnek, így a legérzékenyebb helyen (érfal sérülés) megfelelő mennyiségű trombin és a fibrin képződést biztosítanak.

A prokoaguláns vérlemezkék egyik al csoportja a "*coated*"-vérlemezkék, melyek két különböző, erős agonista (pl. trombin és kollagén) egyidejű aktiváló hatására jönnek létre. Jellemző rájuk, hogy felszínükön nagy mennyiségben található PS, és képesek irreverzibilisen megkötni az α -granulumokból felszabaduló prokoaguláns fehérjéket is, melynek eredményeként fokozott hemosztatikus aktivitással bírnak. A prokoaguláns vérlemezkék létrejötte főleg a GPVI receptoron keresztüli jelátviteli utakon történik. A PS-t expresszáló vérlemezkéken a GPIIb/IIIa többnyire inaktív. Ezzel szemben az aggregáló vérlemezke populációra az jellemző, hogy PS expressziót alig mutatnak, aktivációjukat követően kialakuló intracelluláris kalcium-szint növekedés gyorsan lecseng, és a GPIIb/IIIa receptor aktív konformációban van jelen a felszínükön, ami nagy affinitással köti meg a fibrinogént, mely vérlemezke aggregációhoz vezet.

Az áramlási citometriai vizsgálat könnyen hozzáférhető, egyszerű és gyors hematológiai diagnosztikai eszköz. A prokoaguláns vérlemezkék termelődési-képességének vagy hiányának számszerűsítésére, valamint a fenotípus szempontjából különböző trombocita alpopulációk elemzésére kiválóan alkalmas metodika. A prokoaguláns aktivitás más vizsgálatokkal is

értékelhető, mint például az *ex vivo* trombocita-aktiváció függő trombin képződés és az áramlási kamrában végzett dinamikus vizsgálatok. Azonban ezek az utóbbi technikák egyelőre még kísérleti stádiumban vannak, és diagnosztikai alkalmazhatóságuk további sztenderdizációs vizsgálatokat igényelnek.

Számos vizsgálatban igazolták a protrombotikus állapotú betegekben a fokozott "*coated*"-vérlemezke képződést. A prokoaguláns vérlemezkék átlagos arányát nagyobbak találták stroke és TIA esetén az egészséges kontrollcsoporthoz képest. A vizsgálatok szerint a stroke vagy a TIA bekövetkezésének időpontjában mért nagyobb "*coated*"-vérlemezke szám prognosztikai jelentőséggel bír az agyi keringészavar kiújulásának gyakorisága szempontjából. Ütőérszűkület esetén a legnagyobb prokoaguláns vérlemezke aránnyal jellemzett (>50%) csoportba tartozó betegeknek a korai iszkémiás események kialakulásának kockázata nagy. Hasonlóképpen, a tünetmentes fő nyaki ütőér szűkületben szenvedő betegeknek a "*coated*"-vérlemezkék nagy aránya (45%) előrejelezte a stroke vagy a TIA kialakulásának kockázatát. Továbbá nagyobb prokoaguláns trombocita-aránnyal (42,6%) rendelkező betegeknek gyakrabban jelentkeztek ismétlődő iszkémiás események lakunáris stroke után. Koszorúér-betegségben és szívelégtelenségben is megfigyelték a prokoaguláns vérlemezkék emelkedett arányát. Az akut vaszkuláris események kapcsán végzett "*coated*"-platelet vérlemezke-potenciál meghatározás a súlyosabb kórlefolyás előrejelzésében is segítséget nyújthat. Agyi aneurizma ruptúra kapcsán kialakuló subarachnoidális vérzés esetén a prokoaguláns vérlemezke-képződés növekedése összefüggést mutatott a késleltetett agyi iszkémia kialakulásával és a kongnitív funkciók szignifikáns romlásával. A "*coated*"-vérlemezkék nagyobb átlagos száma volt igazolható dohányozók esetén a nemdohányzókhoz képest. A prokoaguláns vérlemezke arányának változását megvizsgálták olyan dohányos, stroke-on átesett betegeknek, akiknek egy része a stroke után leszokott a dohányzásról. Esetükben a "*coated*"-vérlemezke-képződés mértékének csökkenését észlelték.

A spontán intracerebrális vérzésben szenvedő betegeket vizsgálva, szignifikánsan alacsonyabb prokoaguláns vérlemezke arányt találtak egészséges kontrollhoz képest (24,8 9,7% vs. 32,9 12,6%). Hasonló betegcsoportot vizsgálva, azoknál a betegeknek alakult ki súlyosabb, nagyobb kiterjedésű vérzés, akiknél a legkisebb volt a "*coated*"-vérlemezke produkció. Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy a vérzéses események kimenetele, és az ehhez köthető 30 napon belüli halálozás azoknál a betegeknek volt a legrosszabb, akiknél 27% alatti "*coated*"-vérlemezke arányt mértek. Hasonlóképpen, azoknál a subarachnoideális vérzésben szenvedő

betegeknél volt a legnagyobb az egy hónapos mortalitás, akik 36.7%-nál kisebb "coated"-vérlemezke képződést mutattak. Esszenciális trombocitémia esetén azoknál a betegeknél, akik nem részesültek hidroxiurea kezelésben, szignifikánsan kisebb "coated"-vérlemezke számot észleltek. A hidroxiurea kezelés alatt álló betegek prokoaguláns vérlemezke termelődése közel megegyezett a kontroll csoportéval, függetlenül attól, hogy volt-e korábban tromboembóliás esemény a betegeknél.

3. Célkitűzések

Munkánk célja a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Hematológia Tanszékén gondozott CML-s betegek TKI kezelése során összegyűjtött beteg-, illetve betegség-specifikus adatok részletes feldolgozása, az eredmények értékelése, továbbá az adott TKI kezelés kapcsán észlelt mellékhatások vaszkuláris hematológiai hátterének *in vitro* és *ex vivo* vizsgálata az alábbiak szerint:

I.

A TKI kezelés megkezdése előtt, majd a kezelés során a társbetegségek, valamint az esetlegesen kialakuló mellékhatások pontos felmérése, rendszerezése. A nemkívánatos mellékhatások értékelése, és az alkalmazott TKI kezelés rizikó-adaptált módosítása, és az így elért eredmények prospektív módon való feldolgozása.

II.

A betegek részletes kardio-metabolikus szűrő vizsgálata a TKI kezelés kardiovaszkuláris mellékhatásának megelőzése céljából.

III.

A primer hemosztázis *in vitro* és *ex vivo* vizsgálata a dazatinib és ponatinib kezelés kiváltotta vaszkuláris hematológiai események laboratóriumi jellemzése céljából.

4. Betegek és módszerek

A Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Hematológiai Tanszékén 2010. január 1. és 2020. május 31. között krónikus fázisú CML miatt TKI kezelésben részesülő

120 beteg adatait értékeltük, különös tekintettel a diagnóziskor már fennálló társbetegségekre, a kardiovaszkuláris rizikóra és az egyes TKI-kezelések mellett jelentkező szövődményekre.

A primer hemosztázis *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatai során önkéntes, egészséges donorok, és különböző TKI kezelésben részesülő betegek Na-citráttal alvadásgátolt mintáit vizsgáltuk klasszikus vérlemezke aggregációs módszerekkel (PFA-100, trombin generáció, kollagén indukálta aggregometria, ATP szekréció). Emellett gélfiltrált vérlemezkek (GFP) kettős agonistával (konvulxin + thrombin) történő aktiválását követően a "coated"-vérlemezkek képződését határoztuk meg áramlási citometriai módszerrel TKI kezelés mellett, illetve annak hiányában.

A vizsgálati tervet és a betegdokumentumokat a Debreceni Egyetem helyi etikai bizottsága hagyta jóvá RKEB/IKEB 4875–2017 számú határozata alapján.

A vérlemezke aktivációs és aggregációs vizsgálatokhoz egészséges önkéntesek (*in vitro* vizsgálatok), és krónikus fázisú CML vagy Philadelphia kromoszóma pozitív akut limfoid leukémia miatt dazatinib, ponatinib vagy nilotinib terápiában (*ex vivo* vizsgálatok) részesülő betegek gélfiltrált vérlemezke (GFP) mintáit használtuk. A trombocita aggregáció-gátló kezelést (ha volt), a vizsgálat előtt 7 nappal felfüggesztettük, és mivel a diabetes mellitus is befolyásolhatja a "coated"-vérlemezke számot, a cukorbetegeket kizártuk a vizsgálatból. A TKI kezelésben részesülő betegek a mintavétel időpontjában már legalább 4 hónapja folyamatos TKI kezelés alatt álltak.

A vizsgálatokhoz teljes vért vettünk a könyökhajlat vénájából 0,109 mol/L (3,2%) nátrium-citrátot tartalmazó csőbe (Becton Dickinson, San Jose, CA). A trombocita dús plazma (PRP) készítése során a mintát 10 percig 20 °C-on 170 g-vel centrifugáltuk. A trombocita szegény plazma (PPP) készítésekor a vért 15 percig 20 °C-on 1500 g-vel centrifugáltuk.

4.1. A vérlemezke funkció rutin laboratóriumi vizsgálata

A vérlemezke-funkció szűrése PFA-100 készülékkel (Siemens, Deerfield, IL, USA), kollagén/epinefrin (C/Epi) és kollagén/ADP (C/ADP) patronok használatával történt a berekesztési idő meghatározásával (closure time; CT). Az 1 µg/ml fibrilláris kollagén (Takeda, Linz, Ausztria) vagy 500 µg/ml AA (Labexpert Ltd., Debrecen, Magyarország) által kiváltott vérlemezke-aggregációt és szekréciót Chrono-Log 700 lumiaggregométerrel (Chrono)

vizsgáltuk (Log Corp., Havertown, PA, USA). A vérlemezke-gazdag plazmában a vérlemezke számot $250 \times 10^9/l$ -re állítottuk be trombocita-szegény plazma segítségével. Az aggregációs folyamatot 8 percig követtük, és az eredményeket a fényáteresztés maximális változásának százalékában fejeztük ki (ΔT_{max} %). A trombocita aktiváció során felszabaduló ATP mennyiségét biolumineszcens módszerrel határoztuk meg luciferin-luciferáz reagenssel (Biotherma AB, Handen, Svédország). A maximális ATP szekréciót $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$ vérlemezke-számban fejeztük ki.

4.2. A vérlemezkében gazdag plazma előkészítése, és az *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok tervezése

A fentebb leírt centrifugálást követően a PRP vérlemezke számát trombocita-szegény plazma hozzáadásával $250 \times 10^9/l$ -re állítottuk be.

Egészséges önkéntesektől származó PRP-t használtunk a ponatinib hatásának *in vitro* vizsgálatához. A következő PRP mintákat állítottuk elő:

- nem előkezelt, kollagénnel vagy ADP-vel vagy konvulxinnal aktivált
- ponatinibbel előkezelt, kollagénnel vagy ADP-vel vagy konvulxinnal aktivált

Az előkezeléshez a ponatinibet 75, 150 és 1000 nM-os végkoncentrációban alkalmaztuk (10 perc, 37 °C). Az előkezelt vérlemezkék aktiválására 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kollagént, vagy 5 μM ADP-t vagy 125 ng/ml konvulxint használtunk.

Az *ex vivo* vizsgálatok során dazatinib, ponatinib vagy nilotinib kezelésben részesülő betegek vérmintáiból készített PRP-kat 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kollagén, vagy 5 μM ADP vagy 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ arahidonsav vagy 125 ng/ml konvulxin használatával aktiváltuk.

4.3. Gélfiltrált vérlemezkék előállítása

A PRP minták gélszűrését Sepharose CL-2B oszlopon (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) végeztük, és a tisztított vérlemezkéket $40 \times 10^9/l$ sejt koncentrációra állítottuk be BSGC-ben.

4.4. Áramlási citometriai vizsgálatok

Minden áramlási citometriás elemzést BD FACS-Canto II készüléken (Becton Dickinson, Mansfield, MA, USA) végeztünk, az adatokat pedig a BD FACSDiva szoftverrel (6.1.3 verzió) elemeztük.

A "coated"-vérlemezkék értékelése

A trombocita aktivációt 100 μl ösztérfogatban értékeltük, amely Mix puffert (79 μl), $40 \times 10^9/l$ koncentrációjú GFP-t (10 μl), 1 μl biotinilált fibrinogént (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich) és 10 μl

agonistát tartalmazott. A konvulxin végső koncentrációja 125 ng/ml (Pentapharm, Basel, Svájc), a trombin koncentrációja 0,5 U/ml (szarvasmarha trombin; Sigma-Aldrich) volt. A Mix puffert a következő komponensekből készítettük: 10 mM HEPES, 1 mg/ml BSA, 2,5 mM CaCl₂, 1,25 mM MgCl₂ és 150 mM NaCl. A keveréket 10 percig 37°C-on inkubáltuk, majd a reakciót 200 µl 1%-os (tömeg/térfogat) paraformaldehiddel leállítottuk, és 20 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. Fixálás után 3,5 ml 1 mg/ml BSA-t (PBS/BSA) tartalmazó PBS-t adtunk hozzá, és a mintát 1500 x g-vel 15 percig centrifugáltuk. A pelletet 200 µl anti-CD41a-PECy₅-vel és Streptavidin-PE-vel jelölt PBS/BSA-ban újra szuszpendáltuk, 20 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk, majd PBS-sel történő mosás után ismét a fent említett módon centrifugáltuk, majd végül PBS-ben szuszpendáltuk. A "coated"-vérelemezkek arányát százalékban (%) határoztuk meg.

Az α IIb β 3 integrin aktív konformációjának kimutatása

Az α IIb β 3 integrin aktív konformációját nem aktivált, illetve 20 µM trombin receptor aktiváló peptiddel (TRAP) vagy 25 ng/ml konvulxinnal (GPVI agonista) aktivált minták fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált PAC1 és fikoeritrin-cianin 5 (PECy₅)-konjugált CD41a antitestek kötésével határoztuk meg.

Vérelemezke-monocita heterotípusos aggregátumok vizsgálata

A vérelemezke-monocita aggregátumok meghatározásához egészséges donoroktól (n=6) származó teljes vért 75, 150 és 1000 nM ponatinibbel vagy vivőanyaggal (0,2% DMSO) inkubáltunk 10 percig 37 °C-on, majd a mintákat konvulxinnal aktiváltuk, vagy aktiválás nélkül hagytuk, majd CD14 fikoeritrinnel (PE) és CD42a FITC-vel inkubáltuk. A vörösvérsejteket lizáltuk, a mintákat kétszer mostuk foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS), majd paraformaldehiddel rögzítettük. A vérelemezke-monocita aggregátumok százalékos arányát fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált CD42a kötéssel határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben izotípus kontrollként szolgáló "non-immun" immunglobulin G (IgG) kontroll mintákkal hasonlítottuk össze.

4.6. Alkalmazott statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez a GraphPad Prism 6.01-es verzióját használtuk. Az adatok eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel értékeltük. Az *in vitro* kísérleti csoportok közötti különbségek statisztikai szignifikanciáját Gauss-eloszlás esetén egytényezős ANOVA-val, nem Gauss-eloszlás esetén Kruskal Wallis teszttel elemeztük. A CML-es betegek

gyógyszeradagolás előtti (0 óra), illetve a gyógyszeradagolás után 1 és 4 órával kapott eredményei között adódó különbségek statisztikai szignifikanciáját Gauss-eloszlás esetén páros Student-féle t-próbával, nem Gauss-eloszlás esetén Wilcoxon rangpróbával elemeztük. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p-értékek 0,05 alatt voltak. A TKI kezelésben részesülő CML-es betegek túlélését Kaplan-Meier becsléssel határoztuk meg.

5. Eredmények

5.1. A CML-es betegcsoport klinikai vizsgálata

2010. január 1. és 2020. május 31. között 120 krónikus fázisú CML miatt TKI kezelésben részesülő beteg adatait értékeltük (korábban diagnosztizált és gondozás alatt álló, illetve az ezen időszak alatt újonnan felismert betegek). Az átlagéletkor a diagnóziskor 49 év (15–82 év), a diagnózistól számított átlagos követési idő 110 hónap (3–353 hónap) volt. A TKI kezelés összesített ideje 14 303 hónap volt. A betegek jelentős része (78,3%) az első vonalban imatinib kezelésben részesült. Az első vonalban alkalmazott imatinib kezelés mellett 34,2%-ban alakult ki intolerancia vagy rezisztencia.

A második, illetve többedik vonalban alkalmazott, második és harmadik generációs TKI kezelés mellett akcelerált, illetve blasztos fázis 3 esetben fordult elő. Mindhárom eset T315I-mutáció jelenlétében, valamint már ponatinib kezelés mellett alakult ki, és halálos kimenetelű volt. Allogén őssejt transzplantációra 2 beteg esetén az idős kor, 1 beteg esetén pedig megfelelő donor hiánya miatt nem kerülhetett sor. Egy beteg esetében TKI-rezisztencia (igazolt, többszörös *BCR::ABL1* mutáció) és intolerancia (súlyos és elhúzódó hematológiai toxicitás) miatt összesen ötféle TKI kezelést követően aszciminib terápia indult, amely mellett megfelelően mély molekuláris válasz alakult ki, ám végül addicionális kromoszóma eltérések miatt testvér-donoros allogén őssejt transzplantációra került sor.

A vizsgált időszakban a CML-hez köthető mortalitás 1% volt. A PFS 81%, a teljes túlélés 87% volt. Az első vonalban alkalmazott imatinib kezelésről második generációs TKI-ra váltás oka 68%-ban intolerancia, 32%-ban rezisztencia (primer rezisztencia 5%) volt. A vizsgált időszakban részletesen áttekintettük a TKI terápia során jelentkező mellékhatásokat, különös tekintettel a kardiometabolikus eltérésekre. Értékeljük a nemkívánatos mellékhatások miatt alkalmazott terápia módosítások szükségességét, illetve a kialakult szövődmények kezelésének szakmaspecifikus klinikai gyakorlatát.

5.1.1. Hematológiai toxicitás

Dazatinib kezelés mellett észleltünk leggyakrabban vérkép eltérést (anémia, neutropénia vagy trombocitopénia), valamint a dazatinib terápia közben alakult ki legtöbbször (69%) grade 3-4 trombocitopénia is. A dazatinib dózisának csökkentésével vagy átmeneti kihagyásával, majd a citopénia rendeződését követően a gyógyszer csökkentett dózisban (napi 1x50 mg) való visszaadásával terápia váltásra egyetlen esetben sem volt szükség. Miután a csökkentett dazatinib dózis mellett a vérkép minden esetben tartósan stabil volt, a napi 100 mg dazatinib dózis visszaadható volt. Bozutinib kezelés mellett is gyakran észleltünk hematológiai toxicitást. Két esetben terápia váltásra volt szükség elhúzódó grade 3 neutropénia miatt. Napi 2x300 mg nilotinib kezelés mellett 35%-ban alakult ki súlyos (grade 3-4) hematológiai mellékhatás, illetve ezek közül két esetben a neutropénia fennállása igen elhúzódó volt (3 és 7 hónap). Imatinib kezelés mellett észlelt neutropénia az emelt dózisok (napi 600 mg vagy 800 mg) kapcsán alakult ki gyakrabban. A sztenderd (napi 400 mg) imatinib dózis mellett észleltük a legkevesebb hematológiai mellékhatást. A ponatinib kezelésben részesülő betegek kis száma (n=9) miatt az észlelt toxicitás nem volt reprezentatív. Egy esetben észleltünk grade 2 súlyosságú trombocitopéniát napi 1x45 mg ponatinib dózis esetén.

5.1.2. Kardiovaszkuláris eltérések

Az Európai Kardiológus Társaság által meghatározott rizikó besorolás alapján a nagy és közepes kardiovaszkuláris kockázatú betegeknél minden esetben imatinib kezelést indítottunk. Az első vonalban adott imatinib kezelés mellett (n = 94) nem tapasztaltunk kardiovaszkuláris szövődményt. Kis kardiovaszkuláris rizikó, fiatal kor (≤ 60 év), nagy ELTS-pontszám, és egyéb társbetegségek (diabetes mellitus, COPD, hipertónia, perifériás artériás érbetegség, stb.) hiányában, második generációs TKI (dazatinib vagy nilotinib) terápiát indítottunk el. Dazatinib kezelés (n = 6) mellett nem tapasztaltunk kardiovaszkuláris szövődményt. Nilotinib terápia (n = 17) esetén 2 betegnél stroke, 3 betegnél perifériás artériás elzáródásos betegség, 5 betegnél hipertónia jelentkezett. A stroke és az érszűkület eseteiben a kezelést imatinib adásával folytattuk (n = 3), vagy az elért mély molekuláris válasz miatt a TKI kezelést sikeresen végleg elhagytuk (TFR, n = 2). A kezelés során észlelt hypertonia esetén (n=5) a betegek terápiáját bozutinibre (n = 3) vagy dazatinibre (n = 2) váltottuk, illetve megfelelő vérnyomáscsökkentő kezelést kezdtünk el.

QTc-idő megnyúlást, vagy szívelégtelenségre utaló szív-ultrahang vizsgálati eltérést egyetlen betegnél sem észleltünk.

Többedik terápiás vonalban, T315I-mutáció vagy megelőző imatinib és legalább két második generációs TKI kezelés eredménytelensége esetén alkalmazott, napi 1×45 mg ponatinib kezelés mellett (n = 9) három esetben alakult ki vaszkuláris szövődmény (egy-egy stroke, PAOD, illetve mélyvénás trombózis). Mindhárom beteg megelőzően nilotinib kezelésben is részesült. Nem tapasztaltunk kardiovaszkuláris komplikációt második vagy harmadik vonalban alkalmazott bozutinib terápia során.

5.1.3. Pulmonális események

Emelt dózisú (napi 1×600 mg) imatinib kezelés (n=3) mellett egy esetben alakult ki nem súlyos (grade 2) mellkasi folyadékgyülem, amely az imatinib terápia átmeneti elhagyását, és vízhajtó adását követően napi 1×400 mg dózisban ismét visszaadhatóvá vált. Az első vonalban alkalmazott, napi 1×100 mg dazatinib kezelés (n = 6) mellett egy esetben észleltünk nem súlyos (grade 2) mellkasi folyadékgyülemet. A dazatinib átmeneti elhagyását és vízhajtó adását követően a dazatinib előbb csökkentett (napi 1×70 mg), később teljes dózisban biztonságosan visszaadható volt. A második vonalban adott dazatinib terápia (n = 40) során négy esetben jelentkezett enyhe (grade 1-2) és két esetben súlyos (grade 3) mellkasi folyadékgyülem. A súlyos formában jelentkező hydrothorax miatt terápia váltásra (bozutinibre) volt szükség.

5.1.4. Metabolikus eltérések

A CML diagnózisának megállapításakor 17 esetben volt ismert 2-es típusú cukorbetegség. Ezen betegek döntő többségénél (n=15) imatinib kezelés indult, és a vércukor háztartás az imatinib kezelés mellett is egyensúlyban maradt. Két esetben napi 2×300 mg nilotinib terápia indult, a vércukor háztartás nem változott, a korábbi antidiabetikus kezelésen nem kellett módosítani, de a kezelés alatt mindkét esetben emelkedett lipidértékeket észleltünk, és sztatin terápia is szükségessé vált. Az első vonalban alkalmazott, napi 2×300 mg nilotinib terápia (n=17) esetén csökkent glükóztolerancia három betegnél alakult ki. Két esetben dazatinibre váltottunk, egy esetben diétával és életmód-változtatással a nilotinib kezelés tartósan folytatható volt, a beteg DMR-t ért el, és a nilotinib végleg elhagyhatóvá vált (TFR). A második vonalban napi 2×400 mg nilotinib terápia mellett (n=24) két alkalommal észleltünk antidiabetikus kezelést (metformin) igénylő cukorbetegséget. A nilotinib elhagyását követően, dazatinib kezelés mellett a metformin elhagyható volt.

5.1.5. Gasztroenterológiai szövődmények

Bozutinib kezelés (n=12) mellett jelentkezett a leggyakrabban gasztroenterológiai szövődmény (hasmenés), amely az esetek jelentős részében (n=10) enyhe volt (grade 1-2), és a kezelés indítását követő 2–4. héten jelentkezett. A bozutinib kezelés átmeneti felfüggesztése, tüneti terápia (loperamid), majd kis dóziszról (napi 1×100 mg) való fokozatos dózis-felépítés mellett a hasmenéses tünetek jól uralhatók voltak. Két idős betegnél napi 1×200 mg bozutinib terápia mellett DMR alakult ki, náluk további dózis-emelés nem történt. Két betegnél alakult ki súlyos fokú (grade 3) hasmenés, esetükben a bozutinibet véglegesen el kellett hagynunk, és a terápia módosításra volt szükség.

Első vonalban adott, napi 2×300 mg nilotinib kezelés (n=17) kapcsán észleltünk 3 esetben enyhe (grade 1 vagy 2) hasmenést. A nilotinib átmeneti kihagyását követően a tünetek megszűntek, és ismételt elindítását követően nem jelentkeztek újra.

Sor került betegeink hepatitisz szerológiai szűrővizsgálatára is, amely minden esetben negatívnak bizonyult hepatitisz B- és C-vírus tekintetében. A TKI kezelés mellett nem észleltünk jelentősebb májfunkciós eltéréseket, emiatt terápia-módosításra nem volt szükség.

Betegeinknél napi 1x100 mg dazatinib kezelés során két alkalommal jelentkezett súlyos, transzfúziót igénylő gastrointestinalis vérzés. Colonoscopus vizsgálat során mindkét esetben hemorrágiás kolitisz igazolódott. A primer hemosztázis vizsgálata során a vérlemezke-aggregáció gátlása mellett csökkent "coated"-vérlemezke képződés is kimutatható volt. Ez utóbbi a dazatinib primer hemosztázisra kifejtett gátló hatásának érzékeny indikátora. A dazatinibet elhagytuk, és imatinib kezelésre tértünk át. Újabb gasztrointesztinális vérzést nem észleltünk.

5.1.6. Fogamzás és terhesség

Családtervezési szándékkal egy fiatal nőbetegünk esetén MR4.5 mélységű molekuláris válasz mellett (*BCR::ABL1* [IS]: 0,0032%) a nilotinib kezelést az *in vitro* fertilizáció időszakára több alkalommal átmenetileg felfüggesztettük, a fogamzás azonban többszöri próbálkozással sem történt meg. A DMR fokozatos elvesztése miatt a nilotinib kezelést ismét elindítottuk, melyet követően az *BCR::ABL1* [IS] érték 6 hónapon belül a korábbi, megfelelően mély szintre csökkent (*BCR::ABL1* [IS]: 0,002%).

Egy dazatinib, majd később ponatinib kezelésben részesülő fiatal férfi betegünknek mindkét TKI terápia alatt gyermeke fogant, majd egészséges gyermekei születtek.

5.2. A primer hemosztázis vizsgálata TKI-kezelés során

5.2.1. A dazatinib hatásának vizsgálata a primer hemosztázisra

Azon korábbi megfigyelések alapján, amelyek szerint a dazatinib gátolja a trombocita-aggregációt, valamint hogy a csökkent "coated"-vérlemezké képződés a vérzékenység egyik érzékeny mutatója, vérlemezké aggregációs és "coated"-vérlemezké funkciós vizsgálatokat végeztünk. A dazatinib primer hemosztázisra kifejtett *in vitro* és *ex vivo* hatásainak részletes elemzéséhez egészséges önkéntesek, és dazatinib valamint (negatív kontrollként) nilotinib kezelésben részesülő CML-es betegek vérlemezké funkciót vizsgáltuk meg. A "coated"-vérlemezké képződést gélfiltrált trombocitákban, az aggregációs folyamatokat pedig PFA-100 trombocita funkciós teszttel (teljes vér) és trombocita aggregometriával (PRP) vizsgáltuk. Feltételeztük, hogy a "coated"-vérlemezké képződés megfelelően érzékeny és hatékony eszköz lehet a dazatinib kezelés során jelentkező, vérlemezké aktivációs eltérésekhez kapcsolódó hemorrágiás állapotok kimutatásában (az *in vitro* vizsgálatok eredményeit a társszerző korábban már bemutatta).

Dazatinib vagy nilotinib kezelés alatt álló CML-es betegek vérlemezké aggregációját és ATP-felszabadulását vizsgáltuk közvetlenül a gyógyszer bevétele előtt (0 óra), majd azt követően 1 és 4 órával. A maximális aggregáció szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető 1 óra elteltével mindkét vizsgált trombocita agonista esetében (AA: $p \leq 0,05$, kollagén: $p \leq 0,01$). Az aggregációs görbék 4 órával a gyógyszer bevitelét követően normalizálódtak. Hasonló változásokat figyeltünk meg az ATP felszabadulását vizsgálva. A nilotinibbel kezelt csoportban nem volt változás.

A PFA-100 méréseket is az adott TKI beadása előtt (0 óra), majd azt követően 1 és 4 órával végeztük el. A dazatinibbel kezelt CML-es betegekből származó mintákban a PFA-100 vizsgálatok során a kiindulási eredményekhez képest a C/Epi záródási idő szignifikáns megnyúlását figyeltük meg a bevételt követően 1 órával ($p \leq 0,05$). A záródási idők 4 órával a dazatinib bevitelét követően közel normalizálódtak. A nilotinibbel kezelt csoportban itt sem észleltünk változást. Az *in vitro* vizsgálatok során tapasztaltakhoz hasonlóan a dazatinibbel kezelt CML-es betegekből származó *ex vivo* mintákban a "coated"-vérlemezké képződés szignifikáns csökkenését észleltük a gyógyszer bevitelét követően 1 órával. Ez a hatás 4 órával a gyógyszer expozíciója után is kimutatható volt a dazatinibbel kezelt csoportban. A nilotinibbel kezelt csoportban nem figyeltünk meg változást.

5.2.2. A ponatinib hatásának vizsgálata a primer hemosztázisra

A ponatinib trombocita-funkcióra kifejtett ellentmondásos hatásainak további részletes elemzése céljából kísérleteinkben a ponatinib *in vitro* hatását vizsgáltuk a kollagén által kiváltott trombocita-aggregációra, az ATP szekrécióra és a "coated"-trombocita-képződésre. Továbbá *ex vivo* minták alapján értékeltük a ponatinib hatását a kollagén által kiváltott trombocita-aggregációra. A vérlemezkék aktiválása számos agonista-specifikus vérlemezke receptoron keresztül jön létre. A primer hemosztázis folyamata során a vérlemezkék extracelluláris mátrix fehérjékhez való adhézióját a vérlemezkék aktiválódása és aggregációja követi. E folyamatok során ADP szabadul fel a vérlemezke denz granulumából, amely további trombocita aktivációt okozva elősegíti a trombus képződését.

Kísérleteinkben PRP környezetben vizsgáltuk a kollagén és az ADP által kiváltott aggregációt ponatinib jelenlétében vagy anélkül. A kollagénre adott aggregációs válasz és ATP-szekréció a koncentrációtól függőnek bizonyult, és ez a jelenség 1000 nM ponatinib koncentrációnál vált szignifikánssá mindkét vizsgált paraméternél (a fényáteresztés változásának maximuma (ΔT_{max}) és ATP szekréció). Másrészt, az ADP (5 μM) által kiváltott aggregáció során sem a trombocita-aggregációt, sem az ATP-szekréciót nem befolyásolta a ponatinib. Az $\alpha IIb\beta 3$ integrin aktivációja az egyik legfontosabb lépés a vérlemezke-aggregáció során. Emiatt megvizsgáltuk a ponatinib hatását a PAC1 (egy monoklonális antitest, amely a GPIIb/IIIa receptor aktivált formáján lévő fibrinogénköti helyhez képes kapcsolódni) kötődés által aktivált $\alpha IIb\beta 3$ szintjére. A ponatinib előkezelést követően a vérlemezkéket konvulxinral aktiváltuk, és a PAC1 kötődését mértük. Megfigyeltük, hogy a ponatinib előkezelés dóziszfüggően csökkentette a PAC1 kötő vérlemezkék százalékos arányát a konvulxinral aktivált mintákban, és ezek a változások szignifikánsnak bizonyultak 1000 nM ponatinib végső koncentrációnál a konvulxin aktivált mintákban.

Az *in vitro* vizsgálatok során egészséges kontrolloktól származó GFP-t konvulxin és trombin keverékével aktiváltuk, és áramlási citometriával mértük a "coated"-vérlemezkék mennyiségét. A ponatinib előkezelés dóziszfüggő módon gátolta a "coated"-vérlemezkék képződését. Hat párhuzamos kísérlet eredményeinek összegzése után arra a következtetésre jutottunk, hogy a ponatinib előkezelés már terápiás koncentrációban (150 nM) is szignifikánsan gátolta a "coated"-vérlemezkék képződését, és a "coated"-vérlemezkék mennyisége további csökkenést mutatott 1000 nM ponatinib végkoncentrációnál.

Korábbról az is ismert volt, hogy a CML-es betegek ponatinib-kezelése mérsékelten befolyásolta a vérlemezke-funkciót. Ezen eredmények klinikai jelentőségének további vizsgálatára öt CML krónikus fázisában szenvedő, és ponatinib kezelésben részesülő betegről származó mintát vizsgáltunk meg. A vérmintákat közvetlenül a ponatinib bevétele előtt (0 óra) és 4 órával a TKI bevétele után vettük le. A ponatinib napi dózisa az egyes betegek között eltérő volt, így az adatokat nem tudtuk együttesen értékelni, hanem egyedi eredményként értékeltük azokat. Az *in vitro* vizsgálatokhoz hasonlóan a kollagén által kiváltott trombocita aggregációt határoztuk meg a ponatinibbal kezelt betegek PRP mintáiban. Négy betegnél csökkent kollagén-indukált aggregációs választ mértünk a bevétel előtt levett mintákban. Ezenkívül megfigyeltük, hogy három betegnél volt csökkent a kollagén által kiváltott aggregációs válasz 4 órával a ponatinib beadása után. A ponatinib szignifikáns mértékben gátolta a kollagén által kiváltott aggregációt a ponatinibet szedő betegek esetében (bevétel utáni minták) a kontroll vérlemezkék aggregációjához képest ($p=0,003$). Kiemelendő, hogy egy napi 1×30 mg ponatinib-kezelésben részesülő betegnél a ponatinib terápia megkezdése előtt és 2 hét ponatinib kezelést követően is végeztünk aggregációs vizsgálatokat. A kollagén által kiváltott aggregációk ΔT_{max} értékeit az alábbiak szerint figyeltük meg: ponatinib kezelés előtt 86%, illetve 73% a kezelés alatti időszakban a bevétel előtti mintában, és 75% négy órával az adagolás után levett mintában.

Korábbi irodalmi közlések szerint a ponatinib pro-trombotikus és pro-inflammatorikus hatást fejt ki a TKI-kezelés alatt álló CML-es betegekben. Feltételeztük, hogy a monocita-trombocita aggregátumok elemzése érzékeny indikátora lehet ezeknek a folyamatoknak. Megvizsgáltuk a ponatinib hatását a monocita-trombocita heterotípus aggregátumok kialakulására is. Eredményeink azt mutatták, hogy a ponatinib gátló hatással van a vérlemezke-funkcióra mind PRP, mind pedig GFP környezetben is. Áramlási citometria vizsgálati módszerrel értékeltük a heterotípusos aggregátumok szintjének változását ponatinib előkezelés után nem aktivált és a GPVI receptor agonistával (konvulxin) aktivált mintákban. Nem aktivált vérlemezkéket különböző koncentrációjú ponatinibbal előkezelve nem figyeltünk meg változást a monocita-trombocita heterotípus aggregátumok szintjében. Ponatinib előkezelés és konvulxin aktiválás után a monocita-trombocita aggregátumok százalékos aránya dóziszfüggően nőtt, és ez hatás 1000 nM ponatinib előkezelésnél vált szignifikánssá.

6. Megbeszélés

6.1. A TKI kezelés okozta mellékhatások

6.1.1. Hematológiai toxicitás

A dazatinib kezelés mellett észlelt gyakori hematológiai toxicitás hátterében a dazatinib széles spektrumú BCR::ABL1 gátlása áll. A kisebb specificitású, de a hematopoézis szempontjából fontos egyéb tirozin-kinázok (c-KIT, EPH A2, SRC, LYN, PDGFR) működését is gátolva, a dazatinib terápia gyakran citopénia kialakulásához vezet. A TKI kezelés mellett észlelt anémia a TKI-k által okozott c-KIT gátlás következménye. Ez a receptor elengedhetetlen a normális vérképzéshez és az eritroid sejtek fejlődéséhez. A neutropénia lehetséges oka a TKI-k aspecifikus kötődése az immunrendszer számos kulcsfontosságú kináz célpontjához (LCK, LYN, SRC). A neutropénia minden esetben gyorsan rendeződött a dazatinib kihagyásával, vagy a dózis csökkentésével. Hasonlóképpen, az imatinib is gátolja az LCK-t, de *in vitro* adatok alapján az LCK gátló hatása elmarad a dazatinibéhez képest. Ennek hátterében az áll, hogy az immunmoduláló hatások kiváltásához a szokásoshoz képest nagyobb szérum koncentráció szükséges. Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy nagyobb imatinib dózis mellett gyakrabban alakult ki neutropénia.

A trombocitopénia kialakulásának oka szintén az SFK gátlásával magyarázható, amely a megakariociták és a vérlemezkék egyik fontos jelátviteli fehérjéje. Az SFK-k számos vérlemezke felszíni receptorról közvetítenek jelet, amelyek befolyásolják a vérlemezkék disszeminációját és a vaszkuláris környezetbe való migrációját. Ezért - annak ellenére - hogy a csontvelőben megnövekszik az érett megakariociták száma, az SFK-k aspecifikus gátlása trombocitopéniát okoz a migráció és a pro-platelet képződés gátlása révén. A dazatinib és bozutinib kezelés kapcsán tapasztalt gyakoribb trombocitopénia az SFK-mediált receptor mechanizmusok gátlásával függhet össze. A dazatinib terápia kapcsán 68%-ban észleltük grade 3-4 trombocitopénia előfordulását. Ilyen esetben a dazatinib dózisának csökkentésével, vagy ideiglenes kihagyásával, majd a citopénia rendeződését követően a gyógyszer csökkentett dózisban (napi 1x50 mg) való visszaadásával terápia váltásra nem volt szükség. Miután a csökkentett dazatinib dózis mellett a vérkép stabil volt, a napi 100 mg dazatinib minden esetben visszaadható volt.

6.1.2. Kardiovaszkuláris mellékhatások

A CML felismerésekor a betegek több mint fele 65 évnél idősebb. Ennek megfelelően a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulása is gyakoribb, melyet saját beteganyagunkban

is tapasztaltunk. Tartós (akár évtizedes) kezelés mellett az egyes TKI-k okozta kardiovaszkuláris rizikó (artériás és vénás tromboembólia, akut koronária szindróma, stroke, perifériás érbetegség, hipertónia) igen eltérő gyakoriságú és súlyosságú lehet. A kardiovaszkuláris kockázat különösen jelentős azoknál a 65 évnél idősebb betegeknél, akik második vagy harmadik generációs TKI kezelésben részesülnek. Ezért a kezelés megkezdése előtt részletes kardio-metabolikus szűrővizsgálatok elvégzése javasolt, melyeket a folyamatos TKI terápia mellett adott időpontokban rendszeresen ellenőrizni kell.

A krónikus fázisú CML első vonalbeli kezelésében azoknál a betegeknél, akiknél a szív- és érrendszeri megbetegedések kockázata nagyon nagy, az imatinib, a dasatinib vagy a bozutinib az előnyös választás. Ilyen betegeknél nilotinib kezelés nem javasolt, és csak a kockázati tényezők, a betegség rizikója, valamint a kezelés várható előnyeinek alapos mérlegelése után dönthetünk az alkalmazásáról. Betegeink között az elvégzett kardiovaszkuláris szűrővizsgálatok alapján felismert nagy rizikó esetén mindenkor imatinib kezelést kezdtünk el. Ezek között a betegek között a vizsgálati időszakban nem észleltünk kardiovaszkuláris szövődményt. Kis vagy közepes kardiovaszkuláris kockázatú betegeknél bármelyik TKI választható. A szűrővizsgálatok elvégzése az iszkémiás szívbetegséghez (IHD), az iszkémiás cerebrovaszkuláris eseményekhez (ICVE), vagy a perifériás artériás elzáródásos betegséghez (PAOD) vezető vaszkuláris események idő előtti, valamint a magasvérnyomás betegség időben történő felismerését és megelőzését segíti. A legtöbb klinikai tanulmány nilotinibbal és ponatinibbal kezelt betegek esetében számolt be fokozott kardiovaszkuláris kockázatról. A kardiovaszkuláris szűrés ezekben az esetekben kiemelt jelentőséggel bír.

A nilotinib regisztrációját megelőző multicentrikus, randomizált klinikai vizsgálatban első vonalban napi 2x400 mg nilotinib kezelésben részesülő betegnél 13,4%-ban alakult ki valamilyen kardiovaszkuláris szövődmény (IHD: 8,7%, ICVE 3,2%, PAOD: 2,5%), melyek 8,7%-a volt súlyos. Egykarú, multicentrikus, fázis 3b klinikai vizsgálatban első vonalban napi 2x300 mg nilotinibbal kezelt betegeknél 6%-ban tapasztaltak kardiovaszkuláris szövődményt (IHD: 3,4%, ICVE 0,8%, PAOD: 1,9%), melyek 3,5%-a volt súlyos. A kardiovaszkuláris mellékhatások előfordulásának gyakorisága nilotinibbal kezelt CML-es betegeknél a terápia időtartamával és az életkorral egyértelműen növekedik. Napi 2x300 mg nilotinib dózis mellett az egyes korcsoportokban észlelt IHD előfordulása szignifikánsan gyakoribb idős kor (≥ 75 év) esetén. Nilotinib terápiaiban részesült betegeink esetén (n = 17) stroke (n = 2), intervenciós beavatkozást igénylő perifériás artériás elzáródásos betegség (n = 3), illetve hipertónia (n = 5)

kialakulását figyeltük meg. A stroke és az érszűkület eseteiben a kezelést imatinib adásával folytattuk (n = 3), illetve az elért DMR miatt a TKI kezelést két esetben sikeresen véglegesen felfüggesztettük (TFR). Nilotinib kezelés kapcsán észlelt eredményeink összhangban állnak a nemzetközi irodalomban is közölt kardiovaszkuláris szövődmények előfordulási gyakoriságával. Az általunk 2015. óta alkalmazott szoros kardio-metabolikus szűrővizsgálatok elvégzése az esetleges mellékhatások időbeni felismerését és megfelelő szakmaspecifikus kivizsgálását és kezelését segítette elő.

Ponatinibbel kezelt CML-es betegeknél napi 1x45 mg dózis mellett 31%-ban alakult ki valamilyen kardiovaszkuláris vagy vénás tromboembóliás szövődmény (IHD: 16%, ICVE 13%, PAOD: 14%, vénás trombózis: 6%), melyek 26%-a súlyos (grade 3-4) volt. Egyes betegek esetében egyidőben többféle kardiovaszkuláris szövődmény is kialakulhat. A mellékhatások gyakorisága dózisfüggő. A ponatinib átlagos napi dózisának 15 mg-al való csökkentése - a megfelelő klinikai válasz elérése és fenntartása mellett - a kardiovaszkuláris kockázat 33%-os csökkenésével jár. Jelenleg a ponatinib csökkentett napi dózisa 1x30 mg, mely a megfelelő molekuláris válasz (MR3) elérését követően napi 15 mg-ra csökkenthető. Megelőző imatinib és két második generációs TKI kezelés eredménytelensége, vagy T315I-mutáció esetén alkalmazott napi 1x45 mg ponatinib kezelés mellett (n = 9) három esetben észleltünk vaszkuláris szövődményt (egy stroke, egy PAOD és egy mélyvénás trombózis). Mindkét beteg megelőzően nilotinib kezelésben is részesült.

Nilotinibbel és ponatinibbel végzett *in vitro* kísérletek során mindkét TKI esetén pro-aterogenetikus (fokozott ICAM-1 expresszió) és anti-angiogenetikus hatást (VEGF receptor gátlás) mutattak ki, melyek szerepet játszhatnak a kezelés során észlelt gyakoribb PAOD kialakulásában. Ponatinibbel kezelt betegeknél napi 1x45 mg dózis mellett öt éves medián kezelés idő mellett 14%-ban jelentkezett PAOD, melynek 11%-a volt súlyos. Emiatt a ponatinib kezelés kontraindikált érszűkületes megbetegedés esetén. Enyhe vagy közepesen súlyos érszűkület eseteiben, amennyiben a nilotinib az egyetlen választható TKI, megfelelő körültekintéssel és csak szoros követés mellett (boka-kar index, perifériás artériás Doppler vizsgálat, vérnyomás ellenőrzés, stb.) alkalmazható. Ilyen esetben javasolt az összes kardiovaszkuláris kockázati tényező korrigálása, jóllehet nincs egyértelmű klinikai evidencia arra, hogy ez csökkenti-e a ponatinib vagy a nilotinib okozta fokozott érrendszeri kockázatot.

A nemzetközi irodalmi adatok alapján imatinib, dasatinib és bosutinib kezelés mellett nem észlelték gyakrabban magasvérnyomás betegség kialakulását, melyet saját eredményeink is megerősítettek.

6.1.2. Pulmonális mellékhatások

Mellkasi folyadékgyülem leggyakrabban dasatinib kezelés (első vagy második vonal) mellett alakult ki betegeinknél ($n = 7/51$), amely az esetek nagy részében nem volt súlyos (grade 1-2). Két esetben észleltük súlyos (grade 3) formában hydrothorax kialakulását, amely miatt terápia váltásra (bosutinib) volt szükség. Az irodalmi adatok szerint a mellkasi folyadékgyülem általában a kezelés megkezdését követő néhány hónapban jelenhet meg, de később - akár több évvel a kezelés elindítását követően - is kialakulhat. Igen nagy betegszám mellett megvizsgált, különböző TKI kezelések kapcsán bejelentett mellékhatások adatbázisán végzett statisztikai elemzés szerint a pleurális folyadékgyülem kiemelkedő gyakorisággal fordult elő dasatinibvel kezelt betegek esetén. A lehetséges "off target" molekuláris jelátviteli útvonalak közül az SRC tyrosine kinase (SRK) családba tartozó LYN proto-onkogén gátlásának szerepét valószínűsítették. Ennek a jelátviteli útvonalnak a kiesése olyan nagy granuláris limfociták (LGL) oligoklonális felszaporodásához vezet, amelyek az endotél sejteken T-sejt mediált citotoxikus folyamatot indítanak el. Kontrollált klinikai vizsgálatok során imatinibre rezisztens vagy intoleráns betegeknél második vonalban alkalmazott dasatinib kezelés mellett 13-39% között észleltek pleurális folyadékgyülemet. A hydrothorax kialakulásának aránya nagyobb volt a CML előrehaladott stádiumában, és összefüggést mutatott a dasatinib dózisával is. Fontos megjegyezni azonban, hogy a TKI kezelés mellett tapasztalt mellkasi folyadékgyülem az esetek jelentős részében kevés tünettől járó, nem súlyos mellékhatás (grade 1 vagy 2), ami a TKI dózisának csökkentésével megszűnik, és a dasatinib ismét elindítható. Első vonalban adott dasatinib esetén a mellkasi folyadék megjelenésének medián ideje 10 hónap volt, amely az esetek 89%-ában a kezelés első 8 hete alatt jelent meg. Második vonalban alkalmazva a hydrothorax jelentkezésének medián ideje 5-11 hónap között volt, de volt olyan eset is, amikor 3 évvel a kezelés megkezdését követően jelentkezett. Leggyakrabban száraz köhögés, fáradékonyság, mellkasi fájdalom és nehézlégzés tünetei kísérik, mely esetekben a fizikális és képalkotó (mellkas Röntgen, nagy felbontású komputertomográfia) vizsgálatok elvégzése kötelező.

Bár a folyadékgyülem imatinib kezelés mellett ritkábban jelentkezik, a sztenderd dózisonál nagyobb (napi 600 mg vagy 800 mg) dózisok esetén a perikardiális és pleurális folyadékgyülem

megjelenése gyakoribb. Betegeink között emelt dózisú (napi 1×600 mg) imatinib kezelés ($n=3$) mellett egy esetben alakult ki nem súlyos (grade 2) mellkasi folyadékgyülem, amely az imatinib terápia átmeneti elhagyását és vízajtó adását követően napi 1×400 mg dózisban ismét visszaadhatóvá vált.

6.1.3. Metabolikus eltérések

A szénhidrát- és a zsíryanycsere zavara is gyakran észlelhető mellékhatás TKI kezelés során. Hiperglikémia leggyakrabban nilotinib kezelés mellett alakul ki. Első vonalban alkalmazott nilotinib kezelés esetén a betegek 50%-ában észleltek emelkedett vércukor értékeket, melyből 7% súlyos (grade 3 vagy 4) hiperglikémia volt. Azoknál az imatinibre rezisztens vagy intoleráns krónikus fázisú CML-es betegeknél, akik nilotinib kezelésben részesültek, 12%-ban alakult ki súlyos (grade 3 vagy 4) hiperglikémia. Akcelerált fázis esetén ez az arány 6.7% volt. A hiperglikémia átlagosan egy héttel a kezelés megkezdését követően alakult ki. A nilotinib kezelés elindításakor normoglikémiás, nem diabéteszes betegek között 3 év követési idő alatt 20.1%-ban alakult ki cukorbetegség.

Nilotinibbel kezelt CML-es cukorbeteg 31%-ánál volt szükség az antidiabetikus kezelés módosítására. Ketoacidózis nem fordult elő, de 60%-ban alakult ki súlyos (grade 3 vagy 4) hiperglikémia.

A nemzetközi irodalomban közölt metabolikus eltérésekhez hasonlóan betegeink között is észleltünk TKI kezelés mellett cukorháztartás és zsíryanycsere zavarokat. A CML diagnózisakor 17 betegnek volt ismert 2-es típusú cukorbetegsége. Ezen betegek többsége ($n=15$) imatinib kezelésben részesült. A vércukor háztartás az imatinib kezelés mellett végig egyensúlyban maradt. A korábbról ismert cukorbetegség mellett nilotinib kezelést 2 esetben indítottunk el (fiatal kor és nagy rizikó miatt). A betegek figyelmét fokozottan felhívtuk a diéta pontos betartására, így a korábbi antidiabetikus kezelés (metformin) és diéta mellett a vércukorháztartás egyensúlyban maradt, az orális antidiabetikus kezelésem nem kellett módosítani, molekuláris válaszuk megfelelő. A kezelés alatt azonban mindkét esetben emelkedett lipid értékek jelentkeztek, és sztatin terápia vált szükségessé. Első vonalban alkalmazott, napi 2×300 mg nilotinib terápia ($n=17$) esetén csökkent glükóztolerancia 3 betegünkönél igazolódott. Két esetben dazatinibre váltottunk, egy esetben diétával és életmód-változtatással a nilotinib kezelés tartósan folytatható volt. Később ez a beteg mély molekuláris választ ért el, és a nilotinib végleg elhagyhatóvá vált (TFR). Második vonalban napi 2×400 mg nilotinib terápia mellett ($n=24$) két alkalommal észleltünk diétát és metformin kezelést igénylő

cukorbetegséget. A nilotinib elhagyását követően, dazatinib kezelés mellett, a metformin is elhagyható lett.

Az egyes TKI-k eltérő, a BCR::ABL1 gátlásán túli, nem specifikus hatásai (c-KIT, PDGFR, SRC) különböző pontokon befolyásolják az anyagcsere folyamatok szabályozásának molekuláris útvonalait. Imatinib és dazatinib esetében a vércukor és a lipid profil javulása, nilotinib esetén csökkent glükóztolerancia, diabetes mellitus és a zsíryanycsere paramétereinek romlása figyelhető meg. Az imatinib vércukor háztartásra kifejtett kedvező hatása a hasnyálmirigy β -sejt apoptózis bénítása révén fokozott inzulin szekréciót, valamint a TNF- α útvonal és az endoplazmatikus retikulum stressz gátlásán keresztül fokozott perifériás szöveti inzulin érzékenységet hoz létre.

A nilotinib kedvezőtlen metabolikus profiljának molekuláris háttere ellentmondásos, és kevésbé tisztázott. Egy esettanulmányban csökkent inzulin szekrécióról számoltak be nilotinib terápia során, amely a kezelés felfüggesztését követően reverzibilisnek bizonyult. Egy másik vizsgálatban 37 beteg nilotinib terápiája kapcsán vizsgálták a vércukor anyagcsere változásait, és hiperinzulinémiát, valamint inzulin rezisztenciát állapítottak meg. A TKI kezelés elindítása előtt, majd a kezelés során a betegek kardiometabolikus szűrővizsgálata és követése kiemelkedően fontos, mivel az esetleges anyagcsere kisiklás időben történő felismerése és kezelése megelőzheti a terápia kapcsán egyébként is fokozott kardiovaszkuláris mellékhatások kialakulását.

Ismert cukorbetegség mellett elkezdett TKI kezelést követően a vércukor háztartás szigorúbb ellenőrzése, szükség esetén az antidiabetikus terápia módosítása javasolt. Ilyen esetekben a nilotinib kezelés helyett másik TKI választása ajánlott, de megfelelően kezelt 2-es típusú diabetes mellitus önmagában nem jelent abszolút kontraindikációt nilotinib kezelés szempontjából. Szoros vércukor kontroll, a glikolizált hemoglobin szint ellenőrzése, valamint diabetológus szakorvossal való konzultáció javasolt. Bár a klinikai vizsgálatok során első vonalban nilotinibbel kezelt diabéteszes betegek felénél alakult ki hiperglikémia (grade 3 vagy 4), súlyos szövödményt (ketoacidózis, hiperozmoláris kóma, kórházi kezelés) nem észleltek. A betegek közel háromnegyedének (74%) nem volt szükség az antidiabetikus kezelés módosítására sem, és a követési idő alatt nem alakult ki kardiovaszkuláris megbetegedés.

Nilotinib kezelés esetén a betegek 22%-ban észleltek enyhe (grade 1 vagy 2) koleszterin szint emelkedést. Három hónappal a nilotinib kezelést követően az LDL-koleszterin szint medián emelkedése 33 mg/dL volt. Megelőző TKI kezelésekre rezisztens, ponatinib terápiában részesülő betegek esetén 12%-ban jelentkezett enyhe (grade 1 vagy 2) hipertrigliceridémia. Bozutinib és dazatinib kezelés esetén nem észleltek a lipid háztartásban eltérést. A nilotinib kezelés kapcsán korán (3 hónap) kialakuló nagy koleszterin értékek összefüggést mutattak a PAOD kialakulásával és súlyosságával. A lipid szintek ellenőrzése javasolt a terápia megkezdése előtt, illetve a kezelés során. Nilotinib terápia mellett perzisztáló hiperkoleszterinémia (>6.2 mmol/l) esetén a beteg PAOD szempontjából nagy rizikójúnak tekintendő, és megfelelő sztatin kezelés mielőbbi beépítése szükséges. Vizsgálataink során TKI kezelésben részesülő betegeink között a zsíryanycsere-zavarra utaló eltérést nilotinib kezelés során tapasztaltunk. Korábban ismert cukorbetegség mellett elindított nilotinib kezelés (n=2) esetében, bár a vércukor háztartás nem romlott, emelkedett lipid értékeket észleltünk, és sztatin terápia vált szükségessé.

6.1.4. Gasztrointesztinális mellékhatások

A TKI kezelés okozta gasztrointesztinális tünetek között a hasmenés az egyik leggyakoribb mellékhatás. Klinikai vizsgálatok során leginkább bozutinib kezelés mellett figyelték meg. Napi 1x500 mg bozutinib esetében 8-11%-ban észleltek jelentős (grade 3 vagy 4), a kezelés első hónapjában jelentkező makacs és visszatérő jellegű hasmenést. Azonban csak igen ritkán volt szükség a hasmenés miatt TKI váltásra. A tünetek súlyossága a bozutinib dóziséval összefüggést mutatott. A betegek 67%-a szorult a hasmenés miatt loperamid, atropin vagy diphenoxylate hatóanyagú tüneti kezelésre. Betegeink között napi 1x500 mg bozutinib kezelés (n=12) mellett az esetek jelentős részében (n=10) enyhe fokú (grade 1-2) hasmenés alakult ki, amely a kezelés indítását követően 2–4 héttel jelentkezett. Két esetben súlyos (grade 3) hasmenés miatt a bozutinibet véglegesen el kellett hagynunk, és terápia módosításra volt szükség. Az enyhe esetekben a bozutinib kezelés átmeneti felfüggesztése, tüneti terápia (loperamid), majd kis dózissal (napi 1x100 mg) való ismételt fokozatos dózis-felépítés mellett a hasmenéses tünetek jól uralhatóak voltak. Két idős betegnél, akik a hasmenés miatt csak napi 1x200 mg bozutinib dózist toleráltak, 12 hónap kezelést követően tartós MMR alakult ki. Tapasztalataink szerint a kezelés elindításakor javasolt a terápiás cél-dózis fokozatos felépítése, amely jelentősen csökkenti a gasztrointesztinális tünetek kialakulásának gyakoriságát és mértékét is. A loperamid hatékony a hasmenés tüneteinek enyhítésére.

Dazatinib terápia kapcsán észlelt hasmenés miatt a betegek 1-3%-ában a kezelés átmeneti felfüggesztésére, 2%-ában pedig dóziscsökkentésre volt szükség. Ponatinib kezelés mellett jelentősebb hasmenést nem észleltek. Dazatinib és ponatinib kezelésben részesülő betegeink között nem volt hasmenés. Első vonalban adott, napi 2×300 mg nilotinib kezelés ($n=17$) kapcsán 3 esetben észleltünk enyhe (grade 1 vagy 2) hasmenést. A nilotinib átmeneti kihagyását követően a tünetek megszűntek, és ismételt elindítását követően nem jelentkeztek újra.

Dazatinib kezelés mellett, megtartott trombocita szám ellenére is kialakulhat gasztrointesztinális vérzés. A betegség fázisától függetlenül az esetek 17%-ában észlelték, és leggyakrabban hemorrágiás kolitisz formájában jelentkezett. Koagulációs eltérés 3%-ban volt igazolható, a vérlemezke szám az esetek kétharmadában $100 \times 10^9/L$ alatti volt. A trombocitopénia és a betegség előrehaladott stádiuma a gasztrointesztinális vérzés előfordulásának szempontjából független rizikófaktornak tekinthető. Első vonalban adott dazatinib vagy más TKI kezelés kapcsán nem figyeltek meg fokozott gasztrointesztinális vérzésre való hajlamot. A vérzés kialakulásában szerepet játszik a dazatinib kollagén-indukálta vérlemezke aggregáció gátló hatásán túl a primer hemosztázis jóval érzékenyebb indikátorának tekintett prokoaguláns vérlemezkek képződésére kifejtett gátló hatása is. Dazatinib kezelés mellett jelentkező gasztrointesztinális vérzés esetén a vérzésforrás igazolása szükséges. A gasztroszkópos és kolonoszkópos vizsgálatok eredményének értékelésével lehet dönteni a gyógyszer dózisének csökkentése vagy másik TKI-ra való váltás felől. Betegeinknél napi 1×100 mg dazatinib kezelés során 2 alkalommal jelentkezett súlyos, transfúziót igénylő gasztrointesztinális vérzés. Kolonoszkópos vizsgálat során mindkét esetben hemorrágiás kolitisz igazolódott. A primer hemosztázis vizsgálata során a vérlemezke-aggregáció gátlása mellett a "coated"-vérlemezke képződés csökkenése is kimutatható volt. Ez utóbbi a dazatinib primer hemosztázisra kifejtett gátló hatásának érzékeny indikátora. A dazatinibet elhagytuk, és imatinib kezelésre tértünk át. Újabb gasztrointesztinális vérzést nem észleltünk.

Széleskörű meta-analízis eredményei alapján bármely TKI kezelés esetén szignifikánsan gyakoribb a súlyos (grade 3 vagy 4) májkárosodás kialakulásának esélye a kontroll karhoz képest. TKI kezeléshez köthető, fatális kimenetelű májelégtelenséghez vezető hepatotoxicitás csupán néhány, imatinib és ponatinib kezelésben részesülő beteg kapcsán került eddig leírásra. A szövettani vizsgálat során a legtöbb fulmináns lefolyású esetben nem specifikus gyulladással infiltrátum mellett masszív, vírusos hepatitisz-szerű májszövet nekrozist véleményeztek, amelyet gyulladással idioszinkráziás folyamatok alakítottak ki. Májfunkciós eltérések

(emelkedett GOT vagy GPT szintek) eltérő gyakorisággal és súlyossággal, de az összes TKI kezelés mellett kialakulhatnak. Az TKI kezelés okozta hepatotoxicitás az esetek 25-35%-ában enyhe (grade 1 vagy 2), és csupán átmeneti transzamináz szint emelkedéssel jár. Súlyos (grade 3 vagy 4) forma 2%-ban fordult elő, és leggyakrabban ponatinib kezelés mellett alakult ki. A transzamináz szint emelkedés általában a kezelés megkezdését követően 2-8 héttel jelentkezik, de imatinib kezelés kapcsán ez bekövetkezhet későbbi időpontban is. Ponatinib kezelés elkezdését követően medián 46 nappal (1-334 nap) észleltek GOT vagy GPT emelkedést. Betegeink között a TKI kezelés mellett nem észleltünk jelentősebb (grade 3-4) májfunkciós eltéréseket, emiatt terápia módosításra nem volt szükség.

6.1.5. Fogamzás és terhesség

Azoknál a férfiaknál akik imatinibet, bozutinibet, dazatinibet vagy nilotinibet szedtek, nem növekedett az utódokban a veleszületett rendellenességek kockázata. Ponatinib terápia esetén az adatok hiányosak. A spermiumok minőségében és morfológiájában bekövetkező változások jelen lehetnek a diagnóziskor, és változatlanok maradnak az imatinib kezelés után. A jelenlegi ajánlások szerint családtervezési szándékból a férfiaknak nem kell abbahagyniuk a TKI kezelést.

TKI kezelés alatt bekövetkező terhesség esetén a TKI kezelést az első trimeszterben abba kell hagyni, és azonnal magzati ultrahang vizsgálatot kell végezni. A TKI teratogenitása az organogenezis során a nem specifikus, valószínűleg PDGFR gátlás következménye. A második trimeszterben adott dazatinib kezelés mellett gyakrabban fordul elő hydrops fetalis, így biztonsági okokból az összes TKI ellenjavallt a terhesség alatt. Noha az imatinibet biztonságosan alkalmazták a második és harmadik trimeszterben, a rendelkezésre álló igen kevés tapasztalat alapján inkább nem javasolt a rutin alkalmazás.

A terhesség alatt diagnosztizált CML kezelését személyre szabottan kell elkezdni. A terhesség-megszakítás mindenképpen megfontolandó, amennyiben a diagnózis előrehaladott, nagy rizikójú betegség során igazolódik. Alacsony rizikójú betegség esetén, ha a fehérvérsejt szám alacsony, szoros ellenőrzés mellett a kezelés elindításával egészen a szülésig is várakozhatunk. Trombocitózis esetén acetil-szalicilsav és/vagy alacsony molekulatömegű heparin adása javasolt. Magas fehérvérsejt szám esetén leukaferézis és/vagy α -IFN biztonsággal alkalmazhatóak. Ajánlott a szoros együttműködés a szülész kollégákkal, és fontos a rendszeres magzati ultrahangvizsgálat. A TKI az anyatejbe kis koncentrációban kiválasztódik, a szoptatás ideje alatt nem javasolt alkalmazásuk.

A kezelés felfüggesztésére alkalmas, tartósan mély molekuláris válaszban lévő nők számára a családtervezés időszakára a kezelés felfüggeszthető. Az ezt követő esetleges TKI kezelés az MMR fennmaradásától, vagy annak elvesztésétől függ. Azok a nők, akik a TFR során elveszítik az MMR-t és már terhesek, valószínűleg kihordják a terhességet anélkül, hogy a kezelés újraindítására szükség lenne. Azoknak a nőknek, akik elveszítik az MMR-t, és még nem terhesek, újra kell kezdeniük a TKI kezelést. Imatinib elhagyását követően ilyen esetben megfontolandó második generációs TKI-ra történő váltás, és ha a mély molekuláris választ ismét sikerül elérni, megpróbálható egy újabb kezelésmentes időszak. Nagy kihívást jelentenek azok a nőbetegek, akik tartós mély molekuláris válasz elérése nélkül vágnak a terhességre (gyakran idősebb kor és/vagy társadalmi nyomás miatt). Ilyenkor a lehetséges megoldások között szerepel a TKI kezelés α -IFN-nal való helyettesítése, vagy a fogamzás alternatív módszereinek (béranyaság) megfontolása.

6.2. A primer hemosztázis TKI-kezelés során

6.2.1. A dazatinib *in vitro* és *ex vivo* hatása a primer hemosztázisra

A dazatinibbel végzett III. fázisú klinikai vizsgálatok során a vérzéses szövődmények előfordulási gyakorisága 9–40% (grade 1-4) volt. Ebből súlyos (grade 3-4) vérzéses komplikáció 8%-ban fordult elő. A vérzés elsősorban a gyomor-bél traktust és a központi idegrendszert érintette. A dazatinib kezelésben részesülő betegeknél jelentkező súlyos vérzéses eseményekről számos további esetismertetés kapcsán is beszámoltak. A dazatinibbel végzett korábbi *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok a primer hemosztázis elégtelen működését igazolták. A közölt eredmények a trombocita aktiváció gátlását, a kollagén mátrixon mért, áramlási körülmények között kialakuló thrombus-térfogat csökkenését, PFA-100 vizsgálattal a C/Epi megnyúlt záródási idejét, valamint csökkent epinefrin és AA által kiváltott vérlemezke aggregáció igazoltak.

Dazatinibbel történt vizsgálataink során a dazatinib vagy nilotinib kezelésben részesülő betegek vérlemezke funkcióit a TKI-k bevétele előtt (0 óra) és után (1 és 4 óra) ellenőriztük. A nilotinibet negatív kontrollként használtuk, mivel a korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a nilotinibnek nincs hatása a vérlemezke aggregációra. Tapasztalataink alapján a dazatinib kezelés a trombocita aktiváció és aggregáció károsodását eredményezte. A nilotinibnek egyáltalán nem volt hatása ezekre a folyamatokra. Ezek az adatok összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, annak ellenére, hogy más vizsgálok az *in vitro* kísérletekben csak 10 perces előinkubálást végeztek dazatinibbel. Vizsgálataink szerint a kettős agonistával

aktivált prokoaguláns vérlemezkék csökkent "*coated*"-vérlemezke-képző hatásának kimutatása érzékenyebb módszernek bizonyult, mint a PFA-100 és a vérlemezke aggregáció.

A trombocita kollagén receptora (GPVI) tirozin-kináz-függő módon szabályozza a vérlemezke aktivációt. Az SRC család kinázai (SFK) kulcsszerepet játszanak a vérlemezkék aktiválásában (LYN, LCK, YES, FYN). A LYN nagymértékben expresszálódik a humán vérlemezkékben, és a GPVI citoplazmatikus doménjéhez kapcsolódva foszforilálja és aktiválja a Syk-et. A dazatinib egy erős multikináz-inhibitor (ABL1, c-KIT, EPH A2, PDGF- β , SFK). Bár a nilotinib szintén második generációs TKI, amely számos tirozin-kináz (ABL1, PDGFR, c-KIT, ARG, EPH B4) működését blokkolja, azonban nem gátolja az SFK-t. A trombin G-fehérje által mediált proteáz-aktivált receptoron keresztül fejti ki hatását, melynek során PLC β aktivációt hoz létre, ami kalcium-mobilizációt és PKC-aktivációt, valamint kalcium-kalmodulin-dependens-kinázok, MAP-kinázok és foszfolipáz A2 aktiválásának fokozódását eredményezi. Ezt az utóbbi jelátviteli utat nem befolyásolja sem a dazatinib, sem pedig a nilotinib terápia. Mivel a dazatinib jelentős gátló hatással van a "*coated*"-vérlemezke termelésre, a nilotinib pedig nem, feltételezzük, hogy a GPVI-receptorhoz kapcsolódó SFK kinázok gátlásán keresztül alakul ki a "*coated*"-vérlemezke képződés csökkenés a dazatinib kezelésben részesülő CML-es betegekben.

Korábbi vérlemezke aggregációs vizsgálatok a trombocita aktiváció és aggregáció károsodását igazolták dazatinib kezelés mellett. A vizsgálatok igazolták, hogy a dazatinib hatékonyan gátolja a trombocita jelátvitelt és a kollagén által kiváltott trombocita aktivációs folyamatokat. Adataik azonban eltérő trombocita aggregációs eredményeket, és a kollagén hosszabb ideig tartó trombocita-funkció gátló hatását igazolták. Ezeknek az eltéréseknek a kísérletek eltérő körülményei lehetnek a legfőbb okai. Eredményeik szerint CML-ben szenvedő betegeknél (n = 6) a dazatinib kezelés trombocita aggregáció gátló hatása tovább tartott, mint 4 óra. Fontos megjegyezni, hogy a korábban közölt vizsgálatok során a betegek fele naponta kétszer 70 mg, másik fele pedig naponta egyszer 100 mg dazatinibet kapott. Kísérleteink során minden beteg (n = 10) 100 mg dazatinibet kapott naponta. Farmakokinetikai vizsgálatok alapján a dazatinib felezési ideje 3-6 óra, a C_{max} koncentrációt a gyógyszer bevitelét követően 1 óra alatt éri el, és az adagolási rend hatásai (naponta 1x vagy 2x) jelentős hatással vannak a dazatinib biztonságosságára és hatékonyságára. A dazatinib terápia vérlemezke funkció gátló hatása így valószínűleg kevésbé kifejezett 4 óra elteltével.

A gyomor-bélrendszeri vérzés gyakoribb nemkívánatos esemény dazatinib kezelés során, mint más TKI-k esetén. Bár minden dazatinib kezelésben részesülő betegnél kóros a kollagén által kiváltott trombocita aggregáció, a betegek csupán egy töredékénél alakul ki klinikailag jelentős vérzéses szövődmény. Ennek oka nagy valószínűséggel a dazatinib további, a primer hemosztázis folyamataitól független egyéb hatása lehet. A többi TKI-vel ellentétben a dazatinibról ismert, hogy jelentősen befolyásolja a vaszkuláris endotélium barrier funkcióját is. Az így létrejött vaszkuláris permeabilitás átmeneti növekedése - amelyet a vizsgálatainkkal igazolt "coated"-vérlemezke képződés csökkenése tovább fokoz -, valamint a csökkent trombocita aggregáció mind hozzájárulnak a hemorrágiás szövődmények kialakulásához.

6.2.2. A ponatinib *in vitro* és *ex vivo* hatása a primer hemosztázisra

Számtalan laboratóriumi vizsgálat elemezte már a ponatinib protrombotikus hatásának okát. A vizsgálatok kimutatták, hogy a ponatinib trombo-inflammatorikus választ indukál kollagén- és FeCl₃-sérülési modellekben. Más szerzők egér kísérletekben igazolták, hogy a ponatinib kezelés fokozza a P-selectin expressziót és a GPIIb/IIIa receptor dependens vérlemezke aktivációt. Az észlelt aktivációs hatás azonban csak az agonisták (kollagén vagy trombin) alacsonyabb koncentrációi esetén volt kifejezett. Farmakokinetikai vizsgálatok szerint a ponatinib felezési ideje 27-34 óra, és az átlagos ponatinib C₀ értékek napi 15, 30 vagy 45 mg ponatinib beadását követően 26,2 nM, 56,1 nM és 64,3 nM plazma koncentrációt igazoltak. Ezekben a vizsgálatokban kimutatták, hogy a ponatinib a bevételt követően 4-6 órával érte el a C_{max} értéke, melyek 77 nM és 145 nM voltak napi 15 mg, illetve 45 mg adagolás mellett. Ezért kísérleteinkben a ponatinib hatását a trombocita-agonisták által kiváltott változásokra klinikailag releváns terápiás (75 és 150 nM) és terápiás szinten felüli (1000 nM) koncentrációk esetén vizsgáltuk meg. Megelőző kísérleteinkben a dazatinib prokoaguláns vérlemezke képződés és thrombus retrakció gátló hatását igazoltuk. A dazatinib ezt a hatást különböző tirozin-kináz jelátviteli utak (LCK, LYN, SRC) gátlása révén fejt ki. Mivel a ponatinib is képes ezeket a kináz útvonalakat gátolni, feltehetően a vérlemezke-aggregációt és az ATP-felszabadulást gátló hatást is ezen az "off-target" útvonalon okozza. Ugyanakkor kollagén által kiváltott trombocita aggregációs válasza kifejtett gátló hatást csak jóval a terápiás szint feletti koncentrációnál (1000 nM) figyeltünk meg. Eredményeink összhangban vannak egy korábbi vizsgálattal, amelyben mosott vérlemezkéket használtak. Ebben a vizsgálati környezetben a ponatinib már 100 nM koncentráció esetén gátolta a CRP által kiváltott vérlemezke-aggregációt. Loren és munkatársai azt találták, hogy a ponatinib mosott vérlemezkékhez való *in vitro* hozzáadása gátolta a GPVI aktivációs útvonalakat, és a ponatinibbal kezelt vérlemezkék a

fibrinogénnel vagy kollagénnel fedett felületen kevésbe tapadtak ki, hasonlóan az SRC család specifikus kináz-inhibitorral kezelt vérlemezkékhez. Ezenkívül a ponatinibbel kezelt, fibrinogénhez vagy kollagénnel kapcsolódó vérlemezkék esetében csökkent foszforilációt mutattak ki a GPVI útvonal specifikus kinázainál, hasonlóan az SRC család kináz-inhibitorral kezelt vérlemezkékhez.

A ponatinib előkezelést követően észleltük a GPVI receptorok aktiválódását, mellyel párhuzamosan a vérlemezkék PAC1 monoklonális antitest kötődésének - amely a GPIIb/IIIa receptor aktivált állapotának indikátora - csökkenését figyeltük meg. Ez a hatás szignifikánsan nagyobb volt 1000 nM ponatinib koncentrációnál. Megfigyeléseinkkel összhangban Deb és munkatársai azt találták, hogy a ponatinib csökkentheti a PAC1-kötő vérlemezkék átlagos fluoreszcencia intenzitását a PAR1 és PAR4 receptorok aktiválása esetén 145 nM végső koncentrációnál. Teljes vérmintákban vizsgálva a ponatinib hatását a GPVI receptor aktivációra, nem találtak eltérést.

A dazatinibbel végzett korábbi vizsgálataink alapján feltételeztük, hogy a "coated"-vérlemezke flow citométerrel való kimutatása érzékenyebb módszer lehet a ponatinib gátló hatásának azonosítására, mint a klasszikus trombocita-aggregációs tesztek. GFP környezetben elvégzett kísérleteink során a minták GPVI (konvulxin) és PAR1 (trombin) receptoron keresztüli ko-aktiválásakor a "coated"-vérlemezke termelődés csökkenését figyeltük meg. Ez a hatás már 150 nM ponatinib koncentrációnál szignifikáns volt, 1000 nM koncentrációnál pedig a felére csökkent. A ponatinib általunk észlelt, a "coated"-vérlemezkékre gyakorolt gátló hatását klinikailag relevánsnak tartjuk, mivel korábban azt találtuk, hogy a kimutatásukra alkalmazott áramlási citometriai módszer érzékenyebb, mint a klasszikus trombocita aggregometriára épülő vizsgálatainak módszerek.

A ponatinib-kezelés a CML-betegeknek csak kis hányadára korlátozódik. Olyan betegek esetében javasolt alkalmazása, akiknél más TKI-kezelések sikertelennek bizonyultak, vagy akiknél megtalálható a *BCR::ABL1* ritka, T315I mutációja. Vizsgálataink időpontjában Magyarországon összesen 22 beteg részesült ponatinib kezelésben. Ezen betegek közül csak korlátozott számban (n=5) volt hozzáférésünk a ponatinib kezelés trombocita funkcióra gyakorolt hatásának értékeléséhez. A tartósan ponatinib kezelésben részesülő betegeknél a kollagénnel vizsgált maximális trombocita aggregáció (ΔT_{max} érték) már a következő dózis bevétele előtti (C_0) mintákban jelentősen csökkent volt, és a referencia tartomány alatt maradt.

Így mind az *in vitro*, mind az *ex vivo* eredmények alátámasztják a ponatinib gátló hatását a klasszikus trombocita-agonisták által, a GPVI receptoron keresztül kiváltott vérlemezke aktivációra.

Az *in vitro* vizsgálatokat ellenőrzött körülmények között végeztük egészséges, ponatinibet nem szedő önkéntesek PRP vagy GFP mintáin. CML-es betegek esetében többféle, egyidőben szedett gyógyszer is hatással lehet a plazmában egyébként nagymértékben fehérjéhez kötött ponatinib szabad koncentrációjára. Továbbá a betegek egyéb társbetegségei és a ponatinib plazmában kifejtett hatása is jelentősen eltérhet az *in vitro* alkalmazott, PRP vagy GFP mintákhoz képest. Elvégzett vizsgálataink alapján azt állapítottuk meg, hogy a ponatinib vérlemezkékre gyakorolt gátló hatása összefügg a Sarcoma család kinázainak (LYN, FYN és SRC) gátlásával. Egy korábbi tanulmányban a gátlás mértékét hasonlónak találták a dazatinib és a ponatinib esetében, ami magyarázhatja annak gyengítő hatását a GPVI receptoron keresztüli trombocita aktivációra. Mivel a LYN konstitutívan aktív, a kisebb ponatinib dózis a p-LYN nyílt konformációját eredményezi azáltal, hogy csak a p-LYN Y507 nagyobb érzékenységű gátlóhelyét blokkolta. A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a ponatinib-kezelés megváltoztatja mind az érfal, mind a vérlemezke funkcióit, ami utóbbit hiperaktívvá teszi. Egerekben a ponatinib terápia a vWF által közvetített vérlemezkék adhézióját fokozhatja a mikrovaskuláris endotéliumhoz. A trombocita adhéziót a szabaddá vált A1 domén GPIIb/IIIa kötődése közvetítette az endothelhez, vagy a leukocita-trombocita komplexhez kapcsolódó vWF-hez. Ezek a folyamatok a nagy artériákban és a perifériás mikrocirkulációban egyaránt előfordultak. Ez utóbbi iszkémiás változásokat idézhet elő az egyes szervek (pl. kamrai szívműködésben).

A ponatinibet szedő betegek kardiovaszkuláris eseményei a vérlemezkékre és a keringésben lévő egyéb sejtekre gyakorolt hatás következményei lehetnek. Kísérleti összeállításunkban a ponatinib vérlemezkékre gyakorolt gátló hatását PRP és GFP környezetben vizsgáltuk. A teljes vérminták monocita-trombocita aggregátumok képződésének eredményei azonban a ponatinib lehetséges aktiváló hatását mutatták a vérlemezkékre és/vagy a monocitákra. Vizsgálati eredményeink egyik korlátját a ponatinibvel kezelt betegek mintáinak kis száma jelentette. Továbbá a ponatinib gátló hatását tisztított kísérleti környezetben igazoltuk. Összefoglalva, lumi-aggregációs vizsgálatokkal és a "coated"-vérlemezkék áramlási citometriás módszerrel történő kimutatásával *in vitro* kísérletekben és *ex vivo* mintákban

kimutattuk a ponatinib gátló hatását humán vérlemezkékre, ahol a végső hemosztatikus hatás nagymértékben függ a mérés körülményeitől.

7. Új megállapítások

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Belgyógyászati Klinika, Hematológia Tanszékén gondozott 120 CML-s beteg adatait dolgoztuk fel. A beteg-, illetve betegség-specifikus adatok részletes elemzésével értékeltük a progresszió mentes és a teljes túlélési eredményeket. Részletesen vizsgáltuk az adott TKI kezelések kapcsán jelentkező mellékhatásokat, melyek irodalmi adatokkal kiegészített részletes ismertetését először publikáltuk Magyarországon. A dazatinib kezelés kapcsán észlelt vérzékenységre utaló tünetek, illetve a ponatinib terápiával összefüggő fokozott kardiovaszkuláris kockázat hátterének további vizsgálatára a klasszikus lumi-aggregációs vizsgálatokon túl, a primer hemosztázisban kulcsszerepet játszó "coated"-vérlemezkék kialakulásának változását határoztuk meg.

Dazatinibet szedő CML-es betegek *ex vivo* mintáinak vizsgálata kapcsán igazoltuk, hogy a maximális aggregáció szignifikáns csökkenése alakul ki 1 órával a gyógyszer bevitelét követően. Az aggregációs görbék a dózis után 4 órával normalizálódtak. Ugyanakkor kimutattuk azt is, hogy a dazatinib a "coated"-trombocita képződés szignifikáns csökkenését okozza, és ez a hatás akkor is kimutatható, amikor a hagyományos vérlemezke-funkciós vizsgálatok már nem jeleznek eltérést.

Megállapítottuk továbbá, hogy a ponatinib előkezelés dózisfüggő módon gátolja a "coated"-vérlemezkék képződését, valamint szignifikánsan gátolja a kollagén által kiváltott aggregációt a ponatinibet szedő betegek bevitel utáni mintáiban a kontroll vérlemezkék aggregációjához képest. Eredményeink azt is igazolták, hogy a ponatinib gátló hatással van a GPVI agonisták által kiváltott vérlemezke aktivációra.

Mindezek alapján először igazoltuk, hogy a "coated"-vérlemezke meghatározás érzékenyebb indikátora a dazatinib okozta primer hemosztázis eltéréseknek, mint a klasszikus aggregációs vizsgálatok, továbbá a ponatinib kezelés kapcsán észlelt fokozott kardiovaszkuláris események a primer hemosztázis eltérésein túl egyéb (plazma koncentráció, endothel diszfunkció) tényezők hatásának eredményeként alakulhatnak ki.

8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Batár Péternek szeretném köszönetemet kifejezni, aki szakmai ötleteivel megalapozta a kutatómunkámat. Segítségemre volt a tervezésében, a kivitelezésben, az eredmények értékelésében, és minden probléma megoldásában önzetlenül mellettem állt. Hálas vagyok az élet minden területén nyújtott támogatásáért.

Köszönet illeti Bekéné Dr. Debreceni Ildikót az eredményes közös munkáért, a statisztikai számításokért és az eredményeink összegzésében nyújtott segítségért.

Hálával tartozom Dr. Ujj Györgynek, aki egyetemi éveim alatt, TDK munkám témavezetőjeként felkeltette érdeklődésemet a hematológia iránt.

Köszönöm Illés Árpád professzor úrnak, hogy folyamatosan ösztönözte tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom Kappelmayer János professzor úrnak és Dr. Kerényi Adriennek, akik szakértelmükkel és tanácsaikkal segítették a közös munkát.

Külön köszönet illeti Dr. Baráthné Szikora Évát, aki mindig lelkesen segítségemre volt a betegekkel való kapcsolattartásban, a vizsgálatok és vérvételek megszervezésben és kivitelezésében.

Köszönettel tartozom Dr. Ruszty Katalin Zsófiának és Futó Dórának az adatok rendszerezésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm a közlemények valamennyi társzerzőjének és munkatársaimnak a segítséget és a támogatást.

Végezetül hálásan köszönöm a családomnak, elsősorban a szüleimnek és gyermekeinek a támogatást, azt hogy szeretettel és türelemmel mindvégig mellettem álltak.

9. Közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/387/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mezei Gabriella

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mezei, G.**, Batár, P., Kozma, L., Illés, Á., Kappelmayer, J., Bekéné Debreceni, I.: Ponatinib Exerts an Inhibitory Effect on Collagen-induced Platelet Aggregation and Generation of Coated-Platelets.
Anticancer Res. 41 (10), 4867-4874, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancerres.15300>
IF: 2.435
2. **Mezei, G.**, Bekéné Debreceni, I., Kerényi, A., Reményi, G., Szász, R., Illés, Á., Kappelmayer, J., Batár, P.: Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia.
Platelets. 30 (7), 836-843, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2018.1501470>
IF: 3.378

További közlemények

3. **Mezei, G.**, Illés, Á., Batár, P.: A krónikus myeloid leukaemia tirozin-kináz-gátló kezelésének mellékhatásai és azok gyakorlati ellátása.
Orv. Hetil. 162 (30), 1198-1207, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2021.32177>
IF: 0.707
4. Kotogány, E., Balog, J. A., Nagy, L. I., Alföldi, R., Bertagnolo, V., Brugno, F., Demjén, A., Kovács, A. K., Batár, P., **Mezei, G.**, Szabó, R., Kanizsai, I., Varga, C., Puskás, L. G., Szeben, G. J.: Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-Carboxamide Derivative Induces Differentiation-Coupled Apoptosis of Immature Myeloid Cells Such as Acute Myeloid Leukemia and Myeloid-Derived Suppressor Cells.
Int. J. Mol. Sci. 21 (14), 1-27, 2020.
IF: 5.924





5. Bekéné Debreceni, I., **Mezei, G.**, Batár, P., Illés, Á., Kappelmayer, J.: Dasatinib Inhibits Procoagulant and Clot Retracting Activities of Human Platelets.
Int. J. Mol. Sci. 20 (21), 1-14, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20215430>
IF: 4.556
6. Telek, B., Rejtő, L., Batár, P., Miltényi, Z., Reményi, G., Simon, Z., Ujj, Z., **Mezei, G.**, Szász, R., Kiss, A., Udvardy, M., Illés, Á.: Az akut myeloid leukaemia gyógyszeres kezelése: Jelenlegi lehetőségek, jövőbeli kilátások.
Orvosi Hetilap. 157 (22), 843-848, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2016.30433>
IF: 0.349
7. Reményi, G., **Mezei, G.**, Illés, Á.: FLT3-gátlók akut myeloid leukaemia kezelésében.
Hematol. Transzfuziol. 49 (2), 67-74, 2016.
8. Udvardy, M., Telek, B., **Mezei, G.**, Batár, P., Altorjay, I.: Successful control of massive coumarol induced acute upper GI bleeding and correction of prothrombin time by recombinant active Factor VII (Eptacog-alpha, NovoSeven) in a patient with a prosthetic aortic valve and two malignancies (chronic lymphoid leukaemia and lung cancer).
Blood Coagul. Fibrinolysis. 15 (3), 265-267, 2004.
IF: 1.506
9. Papp, M., **Mezei, G.**, Udvardy, M., Altorjay, I.: Haematológiai és haemostasis paraméterek változása transjuguláris intrahepaticus portosystemas shunt hatására.
Orv. Hetil. 144 (27), 1341-1345, 2003.
10. Telek, B., Rejtő, L., **Mezei, G.**, Karászi, É., Kappelmayer, J., Balázs, M., Kiss, A., Ujj, G., Rák, K., Udvardy, M.: Molekuláris biológiai vizsgálatok kronikus lymphoid leukaemiában = Molecular biology examination in chronic lymphocytic leukemia.
Orv. Hetil. 142 (16), 833-837, 2001.





11. Rejtő, L., Balázs, M., Ádány, R., Rák, K., Telek, B., Kiss, A., Ujj, G., **Mezei, G.**, Balogh, E.,
Udvardy, M.: Fluoreszcencia in situ hibridizációval szerzett tapasztalataink a krónikus
myeloid leukaemia diagnosztikájában és követésében.
Orv. Hetil. 141 (39), 2133-2137, 2000.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,855

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,813**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2023.08.23.

